

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO



Influência das Proteínas Salivares no Sabor dos Alimentos: Estudo da Interação Polifenóis/Proteínas Salivares

Mafalda Magalhães Santos Silva

Mestrado em Bioquímica

Departamento de Química e Bioquímica

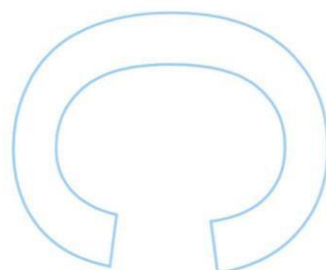
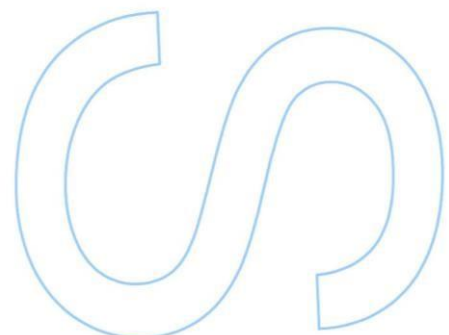
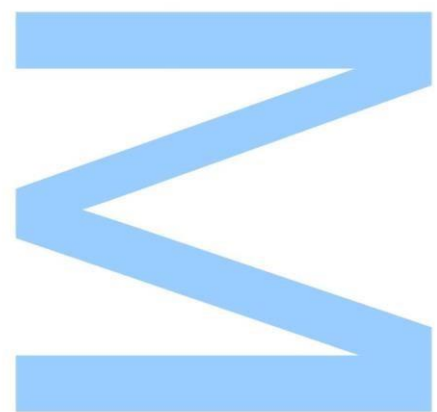
2017

Orientador

Susana Soares, Investigadora Pos-Doc, Faculdade de Ciências da
Universidade do Porto

Coorientador

Victor Freitas, Professor Catedrático, Faculdade de Ciências da
Universidade do Porto



Agradecimentos

Após quase dois anos envolvidos na experiência que permitiu a escrita desta dissertação de mestrado, resta-me agora agradecer as todas as entidades e pessoas que me guiaram ao longo de todo o trabalho.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Fundação Para a Ciência e Tecnologia (FCT) pelo financiamento de uma bolsa de investigação no âmbito do projeto PTDC/AGR-TEC/6547/2014 sem a qual a realização deste trabalho não teria sido possível, bem como ao REQUIMTE-LAQV (UID/QUI/50006/13) pelo apoio financeiro.

Agradeço às instituições que me proporcionaram a realização deste trabalho e de todo o mestrado, à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto (FCUP), em particular ao Departamento de Química e Bioquímica, e ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS). Ainda, ao Instituto Alemão em Nutrição Humana (DIfE) pela disponibilidade em me receber durante cerca de 1 mês e ao Instituto de Investigação e Inovação em Saúde (I3S) por permitir a realização das análises de ITC.

Isto apenas foi possível graças à motivação e conselhos da minha orientadora Susana Soares. A persistência em resolver todos os problemas, a constante organização de todas as tarefas e dedicação para que tudo corresse dentro do planeado são qualidades que não poderia deixar de referir. Para além de mentora, encontrei também uma amiga, sempre disponível para ajudar e com a melhor disposição possível. Contigo não aprendi apenas a usar o HPLC, fluorímetro, NMR, FLIPR, ou ITC, mas aprendi a crescer a nível profissional e pessoal. Não é só o trabalho e bons resultados que fazem alguém sentir-se realizado, mas sim tudo o que os rodeia. O ambiente no grupo dos Polifenóis em muito contribui para este conforto, mas a naturalidade e entusiasmo com que me recebeste foi definitivamente crucial para me sentir bem-vinda. Por isto, e por todas as peripécias que passamos, muito obrigada!

Agradeço ao meu coorientador, o Professor Doutor Victor de Freitas, por todo o apoio e dedicação para que tudo seguisse em frente e da melhor forma. A preocupação contínua pelo bem-estar geral é o que torna o grupo tão bem sucedido e sempre animado. Obrigada pela oportunidade que me proporcionou e por todos os ensinamentos.

Ao Professor Doutor Nuno Mateus, por toda a paciência e descontração. Sempre disponível e disposto a resolver todos os problemas do laboratório e fora dele.

Aos meus colegas de laboratório que me acompanharam todos os dias, sempre presentes para qualquer dúvida, problema e ensinamento. Foram as situações do dia-a-dia que mais me fizeram progredir academicamente, com novos desafios e com o apoio de todos. Ainda, não esqueço todas as dádivas de saliva, reconhecimento e agradeço o esforço

que fizeram em não tomar café! Assim, obrigada Abigail, Ana Luísa, Hélder, Iva, Joana Azevedo, Joana Brás, Joana Oliveira, Luís, Marta, Natércia, Paulinha, Ricardo, Rosa, Sofia, Telmo e Vânia. Não menos importante, agradeço também às meninas de outros laboratórios, Ana Gomes, Cláudia, Mariana e Sílvia pelo auxílio indispensável nas análises realizadas no Centro de Materiais da Universidade do Porto (CEMUP). Ainda, à Fátima e ao Frederico pela ajuda da utilização do ITC no I3S. Em particular atenção, à Elsa e ao Nacho pela amizade e pela motivação, convosco aprendi imenso e partilhei as melhores descobertas. E, como não poderia faltar, à Ana Évora, pelo fortalecer de uma amizade que levo para a vida, pelos desabafos e constante apoio. Uma grande ouvinte e conselheira, alguém que sei que poderei sempre contar.

A todos os meus amigos que, direta ou indiretamente, me ajudaram não só durante o ano de tese, mas também durante todo o meu percurso académico. Ao pessoal da faculdade em particular, obrigada pelas horas de estudo, pelas dúvidas de última hora antes dos exames, pelas festas e gargalhadas partilhadas durante estes 5 anos. Aos restantes, obrigada por todo o carinho e apoio sem os quais não conseguiria ter tanta dedicação e fizeram parecer tudo muito mais simples.

Aos papás, mana, Teté e Kira, não só por me aturarem nos dias em que estava mais rabugenta, mas por nunca desistirem de acreditar em mim. Por fim, ao João que é o meu maior apoio em tudo na vida. Obrigada pela confiança e orgulho incondicional que tens por mim, a ti devo muito do meu trabalho e motivação.

Não acredito que existam experiências vazias, apesar de reconhecer que algumas possam ser mais recompensadoras que outras. Os 5 anos da minha vida no curso de Bioquímica foram sem dúvida imensamente produtivos e sei que foi a melhor formação pela qual poderia ter optado.

Resumo

Para muitos, a adoção de um estilo de vida saudável passa pela escolha de uma alimentação rica em alimentos derivados de plantas e com uma enorme riqueza nutricional. Os polifenóis são compostos presentes neste tipo de alimentos e os seus benefícios para a saúde têm vindo a ser cada vez mais explorados, sendo já reconhecidos como importantes nutracêuticos. Porém, a ingestão de produtos ricos em polifenóis está comumente associada à percepção de sensações desagradáveis pelo consumidor, como a adstringência e o amargor. Apesar de o mecanismo molecular pelo qual a adstringência se desenvolve ainda não estar completamente elucidado, geralmente associa-se este fenómeno às interações estabelecidas entre os polifenóis dos alimentos e as proteínas salivares (PS). Para além disto, pouco se sabe acerca da relação entre a estrutura de diferentes substâncias amargas, em particular dos polifenóis, e a ativação dos recetores responsáveis pelo amargor (TAS2Rs). Como resultado, muitas questões são colocadas no sentido de desvendar que processos e espécies moleculares poderão estar envolvidas nestes dois fenómenos. Deste modo, o objetivo do presente trabalho baseia-se no estudo das interações entre os polifenóis as proteínas salivares e do seu efeito na modelação tanto da sensação de adstringência como do sabor amargo.

Numa primeira fase, foram realizadas análises por extinção de fluorescência e STD-NMR de complexos formados entre 5 diferentes taninos (condensados e hidrolisáveis) e 3 PS pouco abundantes na saliva humana (estaterina, péptido P-B e cistatinas). A determinação das constantes de afinidade e epítomos de ligação permitiram comparar as duas classes de taninos, verificando-se que as interações mais fortes foram estabelecidas entre os elagitaninos e todas as PS, e em particular com o péptido P-B. Por oposição, as PS mais estruturadas (cistatinas) foram as que revelaram uma menor capacidade de interação. Assim, as diferentes afinidades observadas parecem estar diretamente relacionadas com a hidrofobicidade dos polifenóis e a estrutura das PS. Seguidamente, abordou-se uma perspetiva diferente no sentido de compreender se o fenómeno de copigmentação observado em misturas tanino-antocianina teria algum efeito na interação com 2 PS muito descritas na literatura (bPRPs e aPRPs). Os resultados obtidos por STD-NMR e ITC revelaram que a copigmentação não só afeta as interações singulares da (-)-epicatequina e malvidina-3-O-malvidina, como também promove a sua afinidade enquanto mistura. Ainda, verificou-se que o pH é um fator crucial na formação destas mesmas interações.

Com o intuito de compreender o papel dos compostos polifenólicos na percepção do amargor, foram identificados 12 polifenóis capazes de ativar 7 TAS2Rs diferentes.

Verificou-se uma tendência em relação a cada uma das três classes de polifenóis analisadas (taninos condensados, taninos hidrolisáveis e ésteres etílicos), na medida em que todos os compostos de uma mesma classe identificados como agonistas ativaram um TAS2R em específico. Enquanto que os taninos condensados parecem apresentar uma preferência na ativação do TAS2R5, todos os taninos hidrolisáveis ativaram o TAS2R7 e os ésteres etílicos o TAS2R14. As respetivas curvas dose-resposta e valores de EC_{50} foram obtidos para grande parte destas ativações. Os elagitaninos parecem ser, de um modo geral, os ativadores mais fortes entre os polifenóis analisados. Além disto, um outro alvo de estudo foi o efeito das PS na ativação de diferentes TAS2Rs por alguns polifenóis já estudados. Apesar de a ativação do TAS2R5 pela (-)-epicatequina, PGG ou procianidina trimérica C2 não ter sido afetada pela adição de PS, o mesmo não se verificou para as restantes situações analisadas. A exposição a PS desencadeou uma redução da ativação dos TAS2R4 e 39 pela (-)-epicatequina, TAS2R39 pela PGG e TAS2R7 pela malvidina-3-O-glucósido. Estas reduções poderão estar na origem das inconsistências observadas entre estudos *in vitro* e análises sensoriais, uma vez que algumas substâncias, como a malvidina-3-O-glucósido, não são percecionadas como amargas, mas desencadeiam uma resposta dos TAS2Rs.

Palavras-Chave: Polifenóis, Proteínas Salivares, Taninos, Antocianinas, Adstringência, Amargor, Sabor.

Abstract

For most, the adoption of a healthy life style is intrinsically related with a diet rich in plant-derived foods and with a vast nutritional feature. Polyphenols are compounds present in such foods and they have been recognized as important nutraceuticals because of their widely exploit health benefits. However, the intake of products rich in polyphenols are commonly associated with the perception of unpleasant sensations, such as astringency and bitterness. Although the molecular mechanism behind astringency development is not yet fully understood, it is generally associated with the interactions between polyphenols and salivary proteins (SP). Furthermore, little is known about the relationship between bitter compounds' structures, particularly polyphenols' structures, and the activation of bitter taste receptors (TAS2Rs). As a result, several questions related with the species and processes that are involved in such phenomena are arising. Thus, the aim of the present work is to study the interactions between polyphenols and SP and its effect on astringency and bitterness modulation.

First, fluorescence quenching and STD-NMR analysis of complexes between 5 different tannins (condensed and hydrolysable) and 3 less abundant SP (statherin, P-B peptide and cystatins) were conducted. The affinity constants and binding epitopes revealed stronger interactions between ellagitannins and all SP, especially with P-B peptide. The most structured SP (cystatins) were the ones with less interaction capacity. Thus, the relative affinities observed seems to be related with polyphenols' hydrophobicity and SP structures. Then, a different approach was attempted to understand if the copigmentation phenomenon in tannin-anthocyanin mixtures altered the interaction with two known SP (bPRPs and aPRPs). The STD-NMR and ITC results showed that copigmentation not only affects the single interactions of (-)-epicatechin and malvidin-3-O-glucoside, but also improve its affinity as a mixture. Also, the analysis developed inhere revealed that pH is a crucial factor in the formation of these interactions.

In order to understand the role of polyphenols in bitterness perception, 12 compounds were identified as capable of activating 7 different TAS2Rs. A tendency for each of the three polyphenol classes approached (condensed tannins, hydrolysable tannins and ethyl esters) was observed, since every compound of the same class identified as agonist activated a specific TAS2R. While condensed tannins activated preferably TAS2R5, hydrolysable tannins activated TAS2R7 and ethyl esters TAS2R14. The respective dose-response curves and EC₅₀ values were obtained for most activations. Generally, ellagitannins seems to be the stronger activators among the polyphenols approached. On the other hand, the effect of SP on the activation of different TAS2Rs by

some known polyphenols were also a study target. Although TAS2R5 activation by (-)-epicatechin, PGG or procyanidin trimer C2 was not affected by SP introduction, the same result was not observed for the remaining situations. The exposition to SP produced a decrease on TAS2R4 and 39 activations by (-)-epicatechin, TAS2R39 by PGG and TAS2R7 by malvidin-3-O-glucoside. These reductions may be at the origin of the inconsistencies observed between *in vitro* studies and sensorial analysis, since some substances, such as malvidin-3-O-glucoside, are not precepted as bitter but promote TAS2Rs activation.

Keywords: Polyphenols, Salivary Proteins, Tannins, Anthocyanins, Astringency, Bitterness, Taste

Índice

Agradecimentos	III
Resumo.....	V
Abstract.....	VII
Lista de Figuras.....	XI
Lista de Tabelas.....	XIX
Lista de Abreviaturas.....	XXI
I. Introdução	3
1. Polifenóis e principais classes	3
1.1. Flavonóides.....	4
1.1.1. Antocianinas	4
1.1.2. Flavan-3-óis	7
1.2. Taninos	7
1.2.1. Taninos condensados / proantocianidinas	9
1.2.2. Taninos hidrolisáveis	10
1.2.3. Compostos <i>tannin-like</i>	11
2. Copigmentação.....	12
3. Saliva.....	13
3.1. Proteínas salivares (PS).....	13
3.1.1. Proteínas ricas em prolina (PRPs)	14
3.1.2. Estaterina	16
3.1.3. Péptido P-B	16
3.1.4. Cistatinas	16
3.1.5. Outras PS	17
4. Interação polifenóis-proteínas.....	17
4.1. Considerações gerais.....	17
4.1.1. Tipo de interações	19
4.1.2. Modelos moleculares	20
4.2. Interação polifenóis-proteínas salivares	22
4.2.1. Adstringência	23
5. Amargor.....	25
II. Objetivos	31
III. Material e Métodos.....	35
1. Reagentes	35
2. Isolamento, purificação e identificação das PS	35

3. Extração, isolamento e purificação de polifenóis.....	36
3.1. Elagitaninos.....	36
3.2. Procianidinas.....	37
3.3. Malvidina-3-O-glucósido.....	38
4. Síntese de procianidinas.....	38
5. Ensaio de extinção de fluorescência.....	39
5.1. Determinação do tempo de vida (τ_0).....	41
6. Saturation Transfer Difference-Nuclear Magnetic Resonance (STD-NMR).....	41
7. Microcalorimetria de Titulação Isotérmica (ITC).....	43
8. Transfeção e expressão de TAS2Rs.....	44
8.1.1. Determinação da concentração efetiva na inibição de metade da atividade (EC_{50}).....	45
9. Análise Estatística.....	46
IV. Resultados e Discussão.....	49
1. Estudos de interação taninos-PS.....	49
1.1. Extinção de Fluorescência.....	50
1.2. STD-NMR.....	56
1.3. Principais inferências.....	61
2. Estudos de copigmentação.....	62
2.1. STD-NMR.....	63
2.2. ITC.....	68
3. Estudos de sabor amargo.....	77
3.1. Screening de diferentes compostos polifenólicos.....	77
3.2. Curvas dose-resposta.....	84
3.3. Interação polifenol-PS na ativação de TAS2Rs.....	87
V. Conclusão e perspectivas futuras.....	95
VI. Referências.....	99

Lista de Figuras

Figura 1. Estruturas químicas base e exemplos de algumas das principais classes de polifenóis (ácidos fenólicos, estilbenos e flavonóides).

Figura 2. A | Estrutura química base das antocianinas, representada pelo catião flavílio.
B | Estrutura química da malvidina-3-O-glucósido. A abreviação “Glc” refere-se à substituição do grupo na posição 3 do anel C por uma unidade de glucose.

Figura 3. Equilíbrio químico de diferentes espécies de antocianinas, neste caso da malvidina-3-O-glucósido, em meio aquoso e em função do pH do meio. A abreviação “Glc” refere-se à substituição do grupo na posição 3 do anel C por uma unidade de glucose.

Figura 4. Estrutura base dos flavan-3-óis e exemplos de alguns compostos mais comuns.

Figura 5. Estruturas químicas dos taninos. **A |** Estrutura geral das proantocianidinas **B |** Moléculas base dos taninos hidrolisáveis **1.** Ácido gálico **2.** Ácido elágico.

Figura 6. Estruturas químicas de algumas procianidinas diméricas com ligações **A |** tipo A, exemplificadas pela procianidina A2 e **B |** tipo B, correspondentes aos dímeros C4-C6 e C4-C8.

Figura 7. Unidades estruturais HHDP e NHTP características dos elagitaninos, presentes, neste caso, na estrutura química da vescalagina.

Figura 8. Mecanismo exemplificativo das reações de condensação mediadas por acetaldeído que levam à formação de compostos *tannin-like*, neste caso entre flavan-3-óis e antocianinas. Adaptado de Es-Safi, N. *et al.* (2002)

Figura 9. Esquemas dos diferentes tipos de copigmentação. **A |** Copigmentação Intermolecular, **B |** Auto-associação e **C |** Copigmentação Intramolecular. Adaptado de Maite, T. *et al.* (2012)

Figura 10. Percentagens aproximadas das principais classes de proteínas e péptidos salivares encontrados na saliva. aPRPs, proteínas ricas em prolina acídicas; ASH,

albumina de soro humano; bPRPs, proteínas ricas em prolina básicas; gPRPs, proteínas ricas em prolina glicosiladas; IgG, imunoglobulina G; slgA, imunoglobulina A secretora. Adaptado de Messana, I. *et al.* (2008).

Figura 11. Mecanismo molecular proposto para a interação entre polifenóis e proteínas. **A** | Curva de nefelometria representativa da concentração de uma proteína numa mistura com uma concentração fixa de polifenóis. **1.** Excesso de polifenol; **2.** Plateau; **3.** Excesso de proteína. Adaptado de Hagerman, A. *et al.* (1987). **B** | Modelo proposto para interação entre polifenóis com duas extremidades representativas e proteínas com respetivos locais de ligação. Adaptado de Siebert, K. J. *et al.* (1996)

Figura 12. Modelo molecular de ligação proposto para a interação entre polifenóis e proteínas. No **1º passo**, os polifenóis ligados à proteína em vários locais induzem a sua compactação; no **2º passo**, os polifenóis estabelecem ligações cruzadas com outras moléculas de proteína e formam-se complexos insolúveis; no **3º passo**, o agregado final mais complexo precipita. Adaptado de Jöbstl, E. *et al.* (2004)

Figura 13. Representação esquemática da estrutura dos hTAS2Rs e dos seus domínios transmembranares, característicos das proteínas G. Os aminoácidos constituintes destas proteínas estão representados nos círculos por letras, sendo que os delimitados a tracejado correspondem aos resíduos que não são encontrados em todos os recetores. O código de cores utilizado indica a similaridade da sequência entre os 25 hTAS2Rs. Adaptado de Meyerhof, W. (2005)

Figura 14. Representação dos espetros obtidos por STD-NMR. O espetro de diferença resulta da subtração dos espetros obtidos diretamente das medições espectroscópicas, mais precisamente do espetro de *on-resonance* ao de *off-resonance*. A vermelho encontram-se representadas as espécies de ligando e os respetivos sinais no espetro, enquanto que as representações a azul correspondem às espécies não ligantes. Adaptado de Viegas, A. *et al.* (2011)

Figura 15. Representação esquemática da construção dos plasmídeos que contêm os diferentes recetores de sabor amargo (TAS2Rs). A região N-terminal possui uma sequência adicional referente aos 45 aminoácidos (a.a.) do recetor 3 da somatostatina de rato (r3ssr), enquanto a região C-terminal possui o epítipo da glicoproteína D do vírus do herpes simples (VHS).

Figura 16. Estruturas químicas dos taninos estudados: elagitaninos **a)** vescalagina, **b)** castalagina, **c)** punicalagina e procianidinas **d)** B3 e **e)** B6.

Figura 17. Espectro de fluorescência do péptido P-B (30 μM) com concentrações crescentes de punicalagina (0-30 μM), representadas pelas várias cores. A linha a tracejado mostra o comprimento de onda ao qual a intensidade de fluorescência observada é maior, no caso do péptido P-B (313 nm). Este espectro, assim como todos os outros, foi registado ao λ_{ex} de 284 nm.

Figura 18. a) Gráficos de Stern-Volmer representativos da extinção de fluorescência das proteínas salivares (\blacktriangle) estaterina, (\blacksquare) péptido P-B e (\bullet) cistatinas na presença de concentrações crescentes dos três elagitaninos 1. vescalagina, 2. castalagina e 3. punicalagina. **b)** Versão modificada dos gráficos de Stern-Volmer das curvas representadas em **a)** que não apresentam linearidade. Cada curva/reta resulta de ensaios realizados em triplicado.

Figura 19. Gráficos de Stern-Volmer representativos da extinção de fluorescência das proteínas salivares (\blacktriangle) estaterina, (\blacksquare) péptido P-B e (\bullet) cistatinas na presença de concentrações crescentes das duas procianidinas **a)** B3 e **b)** B6.

Figura 20. Espectros de STD-NMR para as interações entre duas das PS (3 μM) e concentrações crescentes de cada tanino. A região representada (8,0-2,0 ppm) corresponde à zona em que os prótons apresentavam maior ressonância. Os espectros foram registados a 600 MHz e 300 K em água deuterada/óxido de deutério (D_2O). Interações entre a PS péptido P-B e os elagitaninos **a)** vescalagina, **b)** castalagina, **c)** punicalagina. Interação entre a PS estaterina e as procianidinas diméricas **d)** B3 e **e)** B6.

Figura 21. Gráficos representativos dos fatores de amplificação de STD (A_{STD}) para as interações entre concentrações crescentes de vescalagina e as três PS (3 μM), **a)** estaterina, **b)** péptido P-B, **c)** cistatinas. Os símbolos representam os valores experimentais, enquanto as linhas correspondem aos valores teóricos calculados pela equação 3.

Figura 22. Gráficos representativos dos fatores de amplificação de STD (A_{STD}) para as interações entre concentrações crescentes de castalagina e as três PS (3 μM), **a)**

estaterina, **b)** péptido P-B, **c)** cistatinas. Os símbolos representam os valores experimentais, enquanto as linhas correspondem aos valores teóricos calculados pela equação 3.

Figura 23. Gráficos representativos dos fatores de amplificação de STD (A_{STD}) para as interações entre concentrações crescentes de punicalagina e as três PS (3 μ M), **a)** estaterina, **b)** péptido P-B, **c)** cistatinas. Os símbolos representam os valores experimentais, enquanto as linhas correspondem aos valores teóricos calculados pela equação 3.

Figura 24. Gráficos representativos dos fatores de amplificação de STD (A_{STD}) para as interações entre concentrações crescentes de procianidina B3 e as três PS (3 μ M), **a)** estaterina, **b)** péptido P-B, **c)** cistatinas. Os símbolos representam os valores experimentais, enquanto as linhas correspondem aos valores teóricos calculados pela equação 3.

Figura 25. Gráficos representativos dos fatores de amplificação de STD (A_{STD}) para as interações entre concentrações crescentes de procianidina B6 e as três PS (3 μ M), **a)** estaterina, **b)** péptido P-B, **c)** cistatinas. Os símbolos representam os valores experimentais, enquanto as linhas correspondem aos valores teóricos calculados pela equação 3.

Figura 26. Estruturas químicas dos polifenóis escolhidos para representar as duas classes de polifenóis, taninos e antocianinas. **A** | (-)-epicatequina e **B** | malvidina-3-O-glucósido. A abreviação “Glc” refere-se à substituição do grupo na posição 3 do anel C por uma unidade de glucose.

Figura 27. Espetros de STD-NMR para as interações entre as duas PS (9 μ M) e concentrações crescentes de cada ligando. A região representada (9,0-2,0 ppm) corresponde à zona em que os prótons apresentavam maior ressonância. Os espetros foram registados a 600 MHz e 300 K em água deuterada/óxido de deutério (D_2O). Interações entre as PS aPRPs e **a)** (-)-epicatequina, **b)** malvidina-3-O-glucósido e **c)** mistura (-)-epicatequina+malvidina-3-O-glucósido.

Figura 28. Gráficos representativos dos fatores de amplificação de STD (A_{STD}) para as interações entre concentrações crescentes de (-)-epicatequina e as duas PS (9 μ M), **a)**

bPRPs e **b)** aPRPs. Os símbolos representam os valores experimentais, enquanto as linhas correspondem aos valores teóricos tendo em conta a **equação 3**.

Figura 29. Gráficos representativos dos fatores de amplificação de STD (A_{STD}) para as interações entre concentrações crescentes de malvidina-3-O-glucósido e as duas PS (9 μ M), **a)** bPRPs e **b)** aPRPs. Os símbolos representam os valores experimentais, enquanto as linhas correspondem aos valores teóricos tendo em conta a **equação 3**.

Figura 30. Gráficos representativos dos fatores de amplificação de STD (A_{STD}) para as interações entre concentrações crescentes da mistura (-)-epicatequina+malvidina-3-O-glucósido (EC+Mv-3-O-glc) e as duas PS (9 μ M), bPRPs (\blacktriangle) e aPRPs (\blacksquare). Os símbolos representam os valores experimentais, enquanto as linhas correspondem aos valores teóricos tendo em conta a **equação 3**. Os *fitting* das curvas foram realizados considerando os protões referentes à **a)** (-)-epicatequina (EC) e **b)** malvidina-3-O-glucósido (Mv-3-O-glucósido) separadamente.

Figura 31. Interações por ITC referentes às bPRPs (20 μ M) a pH 1,0. À esquerda estão representados os termogramas, enquanto que à direita se encontram os gráficos consequentes do *fitting* (linhas a vermelho) dos pontos experimentais (pontos a preto). As interações foram realizadas com três ligandos: **A** | (-)-epicatequina, **B** | malvidina-3-O-glicósida e **C** | 1:1 (-)-epicatequina:malvidina-3-O-glucósido.

Figura 32. Interações por ITC referentes às bPRPs (20 μ M) a pH 3,5-4,0. À esquerda estão representados os termogramas, enquanto que à direita se encontram os gráficos consequentes do *fitting* (linhas a vermelho) dos pontos experimentais (pontos a preto). As interações foram realizadas com dois ligandos: **A** | malvidina-3-O-glicósida e **B** | 1:1 (-)-epicatequina:malvidina-3-O-glucósido.

Figura 33. Interações por ITC referentes às aPRPs (30 μ M) a pH 1,0. À esquerda estão representados os termogramas, enquanto que à direita se encontram os gráficos consequentes do *fitting* (linhas a vermelho) dos pontos experimentais (pontos a preto). As interações foram realizadas com dois ligandos: **A** | malvidina-3-O-glicósida e **B** | 1:1 (-)-epicatequina:malvidina-3-O-glucósido.

Figura 34. Interações por ITC referentes às aPRPs (30 μ M) a pH 3,5-4,0. À esquerda estão representados os termogramas, enquanto que à direita se encontram os gráficos

consequentes do *fitting* (linhas a vermelho) dos pontos experimentais (pontos a preto). As interações foram realizadas com dois ligandos: **A** | malvidina-3-O-glicósida e **B** | 1:1 (-)-epicatequina:malvidina-3-O-glucósido.

Figura 35. Ativação dos TAS2Rs pelos diferentes compostos polifenólicos, representada pela alteração da fluorescência de células HEK293T marcadas com Fluo4-AM e transfetadas com os TAS2Rs representados nos gráficos. Todos os ensaios foram realizados em triplicado, apesar de alguns casos apenas mostrarem duplicados.

Figura 36. Estruturas químicas dos taninos condensados: **a)** dímero B1, **b)** dímero B4, **c)** dímero B7, **d)** B2g, **e)** EGCG e **f)** (-)-epicatequina.

Figura 37. Estruturas químicas dos taninos hidrolisáveis: **a)** vescalagina, **b)** castalagina, **c)** punicalagina, **d)** grandinina e **e)** PGG.

Figura 38. Estruturas químicas dos ésteres etílicos: **a)** ácido ferúlico, **b)** ácido protocatechuico e **c)** ácido vanílico.

Figura 39. Estrutura química da antocianina malvidina-3-O-glucósido. A abreviação “Glc” refere-se à substituição do grupo na posição 3 do anel C por uma unidade de glucose.

Figura 40. Curvas dose-resposta para as células HEK293T transfetadas com os diferentes TAS2Rs que apresentaram ativação quando estimulados pelos diferentes compostos fenólicos indicados. A amplitude dos sinais é dada pelas alterações relativas de fluorescência, sendo representada por $\Delta F/F$. Os pontos representam os valores experimentais obtidos em triplicado para cada concentração (escala logarítmica) de polifenol testada, com os respetivos erros padrão associados. A linha a cheio corresponde ao melhor *fitting* traçado para os valores experimentais, enquanto que a linha a tracejado representa os valores experimentais de *mock* observados.

Figura 41. Ativação dos TAS2Rs pela **A** | (-)-epicatequina (EC), **B** | PGG e **C** | malvidina-3-O-glucósido (Mv-3-O-glc) separadamente (linhas a cheio) e quando em interação com a mistura de PS (linhas a tracejado), representada pela alteração da fluorescência de células HEK293T marcadas com Fluo4-AM e transfetadas com os TAS2Rs representados.

Figura 42. Representação gráfica da percentagem de ativação de cada TAS2R indicado como resultado da adição da mistura de PS, por comparação com os sinais de fluorescência desencadeados pelos polifenóis quando estes interagem somente com os TAS2Rs. **A** | (-)-epicatequina, **B** | PGG e **C** | malvidina-3-O-glucósido. Todos os gráficos são significativamente diferentes ($p < 0,05$), com exceção dos identificados com *.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) e aparentes (K_{app}) para a interação das proteínas salivares (PS) estaterina, péptido P-B e cistatinas com os três elagitaninos e os dois taninos condensados. Os valores com diferentes letras são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

Tabela 2. Valores determinados do tempo de vida (τ_0) de cada proteína salivar (PS) e das constantes bimoleculares (k_q) para as interações entre as PS estaterina, péptido P-B e cistatinas, os três elagitaninos (vescalagina, castalagina e punicalagina) e os dois taninos condensados (dímeros B3 e B6).

Tabela 3. Valores de constantes de associação (K_A) estimados para as interações entre cada uma das três proteínas salivares (PS) e os diferentes taninos, considerando as equações 3 e 4.

Tabela 4. Valores de constantes de associação (K_A) estimados para as interações entre cada uma das duas proteínas salivares (PS) e os diferentes ligandos, considerando as equações 3 e 4.

Tabela 5. Número de locais de ligação na PS (n) e valores de constantes de ligação (K_A) para as interações da (-)-epicatequina, malvidina-3-O-glucósido e a mistura 1:1 destes dois polifenóis (EC+Mv-3-O-glc) com as duas PS estudadas (bPRPs e aPRPs) a **A** | pH 1,0 e **B** | pH 3,5-4,0. A coluna Set (1,2 ou 2,2) corresponde aos parâmetros individuais de cada set de locais de ligação.

Tabela 6. Parâmetros termodinâmicos (ΔH , ΔG e $-T \Delta S$) para as interações da (-)-epicatequina, malvidina-3-O-glucósido e a mistura 1:1 destes dois polifenóis (EC+Mv-3-O-glc) com as duas PS estudadas (bPRPs e aPRPs) a pH 3,5-4,0.

Tabela 7. Tabela resumo das ativações dos 8 TAS2Rs resultantes da adição de 12 diferentes compostos fenólicos. O sinal “+” corresponde à observação de uma resposta, o que corresponde à ativação de um recetor. Os restantes TAS2Rs não são referidos, uma vez que não se verificou nenhum sinal representativo de uma ativação.

Tabela 8. Valores de EC_{50} para os 10 compostos polifenólicos que mostraram um efeito ativador de alguns TAS2Rs e cujas curvas dose-resposta apresentaram um perfil bem definido. Os valores com diferentes letras são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Lista de Abreviaturas

A_{STD} | Fator de Amplificação de STD

ACN | Acetonitrilo

ASH | Albumina de soro humano

aPRPs | Proteínas ricas em prolina ácidas

bPRPs | Proteínas ricas em prolina básicas

BSA | Albumina de soro bovino

B2g | Procianidina B2 galhato

DMEM | *Dulbecco's modified Eagle medium*

EC₅₀ | Concentração efetiva na inibição de metade da atividade

EGCG | Epigallocatequina galhato

FCS | Soro fetal de bezerro

FLIPR | Leitor de placas de imagem de fluorescência

Fluo4-AM | Fluo-4-acetoximetilester

FRET | Transferência de energia de ressonância por fluorescência

GPCR | Recetor acoplado à proteína G

gPRPs | Proteínas ricas em prolina glicosiladas

HEPES | Ácido *N*-2-hidroxietilpiperazina-*N'*-2-etanosulfónico

HHDP | Hexahidroxidifenol

HPLC | Cromatografia líquida de alta eficiência

IgG | Imunoglobulina G

ITC | Microcalorimetria de titulação isotérmica

K_A | Constante de associação

K_{app} | Constante aparente de Stern-Volmer

K_q | Constante bimolecular

K_{SV} | Constante de Stern-Volmer

LC-MS | Cromatografia líquida seguida de análise por espetrometria de massa

NHTP | Nonahidroxiterfenol

PGG | Pentagalhoíglucose

pI | Ponto isoelétrico

PRPs | Proteínas ricas em prolina

PS | Proteínas Salivares

RMN | Ressonância Magnética Nuclear

r3ssr | Recetor 3 da somatostatina de rato

slgA | Imunoglobulina A secretora

STD-NMR | *Saturation-Transfer Difference-Nuclear Magnetic Resonance*

TAS2Rs | Recetores de sabor amargo no ser humano

TFA | Ácido Trifluoroacético

TRC | Células Recetoras de Sabor

UV-Vis | Ultravioleta-visível

VHS | Vírus do herpes simples

I. Introdução

I. Introdução

1. Polifenóis e principais classes

A designação de polifenóis é atribuída a uma classe de compostos químicos característicos por serem constituídos estruturalmente por grupos fenólicos que derivam da L-fenilalanina. Podem ser encontrados naturalmente numa grande variedade de plantas, resultando do seu metabolismo secundário (vias do chiquimato e do acetato)^{1, 2} e, portanto, constituem muitas vezes a primeira linha de defesa destes seres. Deste modo, podem ser considerados pesticidas naturais, protegendo as plantas contra infestações por microrganismos patogénicos, parasitas ou predadores no geral. Além destas funções, os polifenóis estão também envolvidos no crescimento das plantas, são responsáveis pela sua coloração (pigmentação) e ainda atuam como importantes antioxidantes naturais.³ Dietas à base destes compostos têm vindo a despertar a atenção dos consumidores e investigadores, não só pelas suas características antioxidantes, mas também pelos seus conhecidos efeitos anticancerígenos, antimutagénicos e antialérgicos.⁴ Tendo em conta as referidas propriedades benéficas, a extensão da aplicabilidade destes compostos tem vindo a tornar-se cada vez mais vasta. Desde a área alimentar na modelação do sabor, passando pela saúde na prevenção de doenças dos foros neurodegenerativo e cardiovascular, até à área da cosmética para retardação do aparecimento de rugas,⁵ os polifenóis são compostos verdadeiramente versáteis. No entanto, muitas vezes os efeitos associados a estes compostos podem não ser considerados positivos, dependendo do intuito da sua aplicação. Ao interagirem com proteínas, amidos ou enzimas digestivas, reduzem o valor nutricional dos alimentos, além de que podem tornar-se tóxicos quando ingeridos em grandes quantidades.^{3, 6}

Pela sua grande variedade estrutural e funcional, muito já se encontra descrito acerca das potencialidades dos polifenóis no geral.^{2, 6, 7} Porém, a sua contribuição para a modelação de variadas características organolépticas dos alimentos (cor e sabor) parece ser ainda o grande impulsionador da investigação em torno destes compostos químicos. Neste sentido, muitos dos estudos científicos que abordam a temática dos polifenóis focam-se na sua capacidade de se ligar a outros compostos naturais (proteínas, polissacáridos, alcaloides, etc.), promovendo inúmeras alterações biológicas.

As propriedades biológicas dos polifenóis, como a biodisponibilidade, atividade antioxidante e capacidade de interação, estão dependentes das suas estruturas, podendo ser assim diferenciados em várias classes: ácidos fenólicos (e.g. ferúlico, protocatechuico, vanílico), estilbenos, flavonóides e lignanos (**Figura 1**).⁸ Os ácidos fenólicos são constituídos por um único anel benzénico, contrastando com os estilbenos que possuem

dois anéis, e ainda mais com os flavonóides que para além dos anéis benzénicos A e B possuem ainda um anel heterocíclico C pirano a ligá-los. As formas mais complexas dos polifenóis envolvem geralmente polímeros destas estruturas mais simples.¹ Os polifenóis encontrados nos alimentos podem ser também classificados de uma forma mais generalizada, englobando duas grandes famílias, os compostos flavonóides, os mais abundantes na dieta, e não-flavonóides.⁴ Os primeiros apresentam uma estrutura carbonada C6-C3-C6 e, apesar de alguns se encontrarem sob a forma de agliconas (sem resíduos de açúcar), grande parte dos flavonóides são constituídos por um ou mais grupos glicosilo ligados (flavonóides glicosilados), o que explica a grande diversidade estrutural que esta classe apresenta. Os flavonóides podem ainda ser distinguidos em várias subclasses, nomeadamente as antocianinas e os flavan-3-óis. A principal distinção prende-se com o grau de oxidação do oxigénio heterocíclico e no padrão de substituição do anel C, no entanto, existem ainda algumas diferenças estruturais dentro de cada classe que permitem distingui-los entre si.^{1, 4}

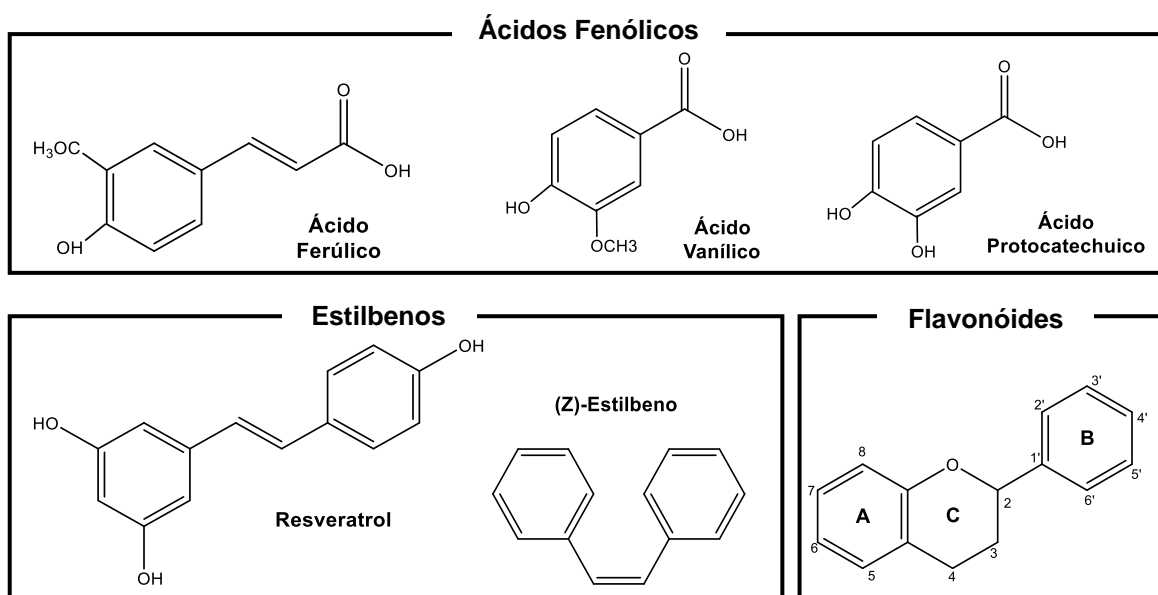


Figura 1. Estruturas químicas base e exemplos de algumas das principais classes de polifenóis (ácidos fenólicos, estilbenos e flavonóides).

1.1. Flavonóides

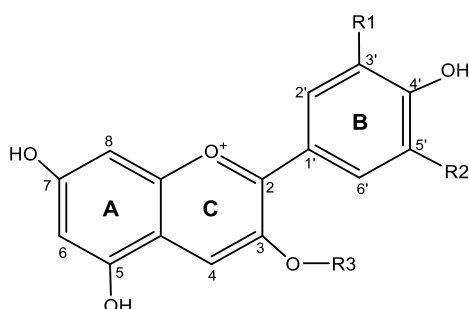
1.1.1. Antocianinas

As antocianinas são pigmentos fenólicos das plantas e são os responsáveis pelas suas colorações vermelha, azul e roxa.⁴ São compostos solúveis em água, extremamente sensíveis às condições do meio, em especial o pH.

As antocianidinas são as agliconas das antocianinas, sendo estas as moléculas mais simples. As restantes antocianinas derivam do catião flavílio (**Figura 2.A.**)

glicosilado, variando no grau de hidroxilação e metoxilação. Esta forma glicosilada é a mais comumente encontrada na natureza, em especial nos frutos. O número e posição de moléculas de açúcar ligados à estrutura base varia conforme a antocianina, assim como a presença e tipo de ácidos esterificados. Esta glicosilação é mais frequente na posição O-3 do anel C, mas ainda é possível ocorrer nas posições O-5 e O-7 do anel A do catião flavílio. Para além da glucose, presente no caso da malvidina-3-O-glucósido (**Figura 2.B.**), muitos outros açúcares podem ser encontrados nestas estruturas, incluindo a ramnose, galactose e xilose.^{9, 10}

A.



B.

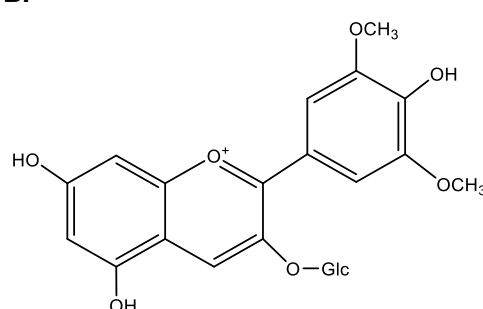


Figura 2. A | Estrutura química base das antocianinas, representada pelo catião flavílio. **B** | Estrutura química da malvidina-3-O-glucósido. A abreviação "Glc" refere-se à substituição do grupo na posição 3 do anel C por uma unidade de glucose.

Quando em solução, as antocianinas interagem facilmente entre si e também com outros compostos polifenólicos, o que influencia a cor que apresentam. Apesar de a forma mais comum ser representada pelo catião flavílio (cor vermelha, AH^+), em meios aquosos esta estrutura sofre rapidamente reações de transferência de protões, o que conduz à formação de bases quinonoidais azuis (aniónicas, A^-) e violetas (neutras, A), hemiacetais incolores (B) e/ou chalconas amarelas (C) (**Figura 3**).¹¹ Assim, o pH determina a proporção das espécies de antocianinas presentes, e, consequentemente, a cor destas soluções, sendo que o ião flavílio é a forma predominante em meios ácidos (pH 1-2).¹²

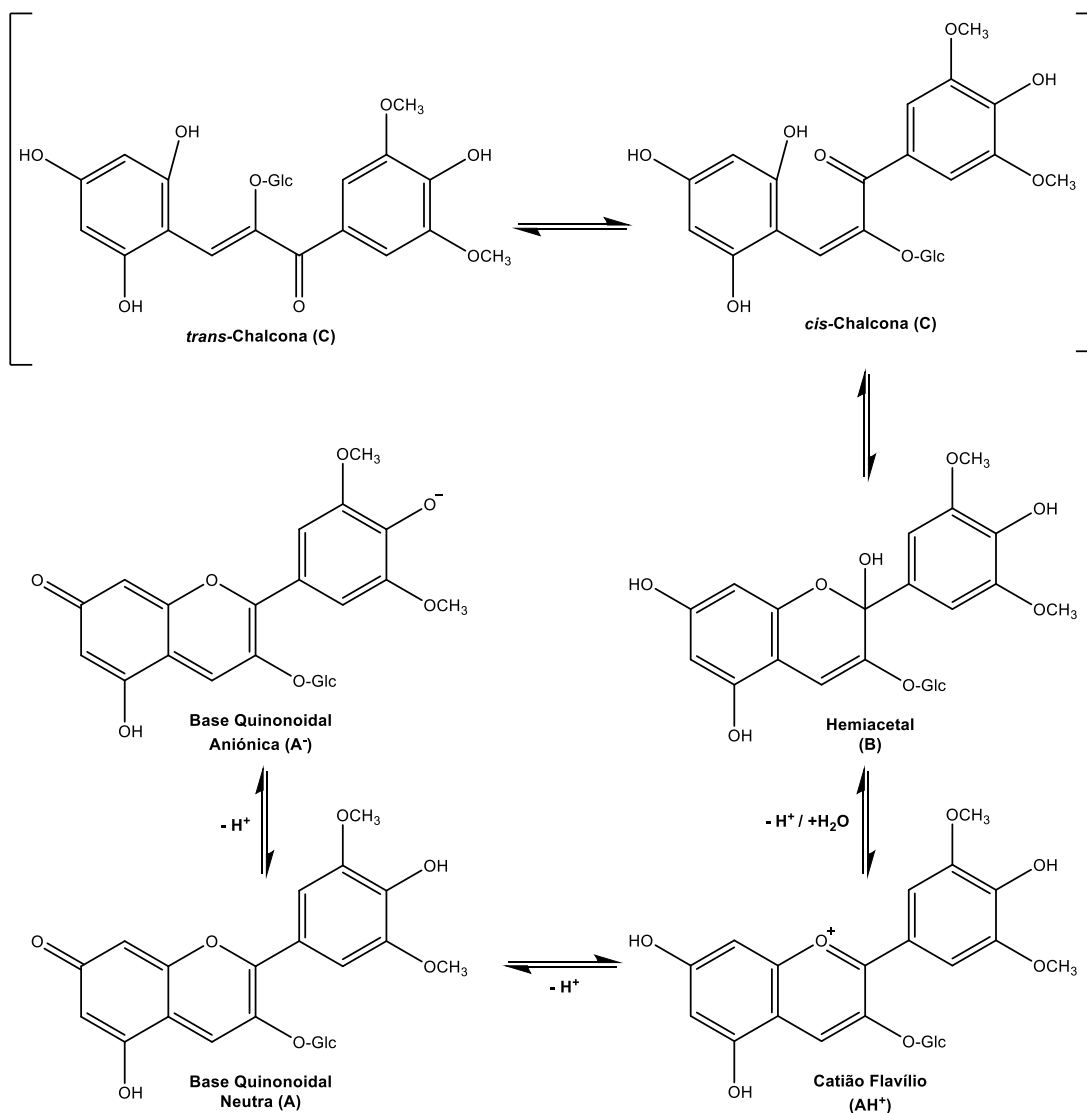


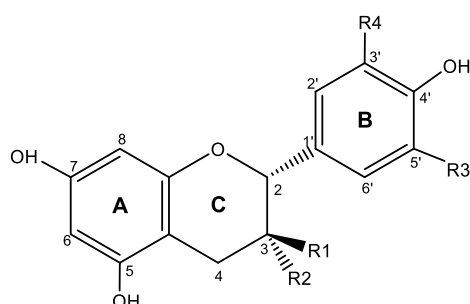
Figura 3. Equilíbrio químico de diferentes espécies de antocianinas, neste caso da malvidina-3-O-glucósido, em meio aquoso e em função do pH do meio. A abreviação "Glc" refere-se à substituição do grupo na posição 3 do anel C por uma unidade de glucose. Adaptado de Brouillard, R. *et al.* (1990)

Devido às inúmeras variantes estruturais que esta classe de polifenóis permite, a diversidade de antocianinas na natureza é realmente incalculável. Assim, a variabilidade de cores que estes pigmentos admitem, as suas conhecidas propriedades antioxidantes e os potenciais efeitos benéficos para a saúde fazem das antocianinas uma grande fonte de investimento a nível industrial, mas também científico. Encontra-se já descrito na literatura que estes compostos, em particular a malvidina-3-O-glucósido, poderão contribuir para o sabor dos frutos (e.g. adstringência e amargor).^{13, 14} Não obstante, as antocianinas são mais frequentemente associadas à cor dos alimentos e bebidas, como o vinho tinto.

1.1.2. Flavan-3-óis

Os flavan-3-óis incluem diversas estruturas, desde a unidade monomérica dos isómeros (+)-catequina e (-)-epicatequina de baixo peso molecular, às proantocianidinas de diferentes graus de polimerização. Estes compostos diferem entre si pela estereoquímica do carbono C3 do anel C e pelo grau de hidroxilação do anel B (um, dois, ou três grupos hidroxilo). Além disto, alguns compostos desta classe de polifenóis apresentam-se esterificados com um ácido gálico na posição 3 do anel C por uma ligação éster (**Figura 4**).¹

Esta é a classe de flavonóides mais abundante na dieta alimentar e está normalmente mais associada ao sabor dos alimentos do que as antocianinas, sendo muitas vezes referidos como importantes modeladores da adstringência e também do amargor.¹⁵ Ainda, existem vários estudos que descrevem as suas capacidades antioxidante, de cardio- e neuro-proteção e prevenção de cancro, estando estas relacionadas diretamente com a promoção da saúde.¹⁶



Flavan-3-ol	R1	R2	R3	R4
(+)-afzelequina	OH	H	H	H
(+)-catequina	OH	H	H	OH
(-)-epicatequina	H	OH	H	OH
(+)-galhocatequina	OH	H	OH	OH
(+)-epigalhocatequina	H	OH	OH	OH
(-)-epigalhocatequina galhato	H	O-galhoilo	OH	OH

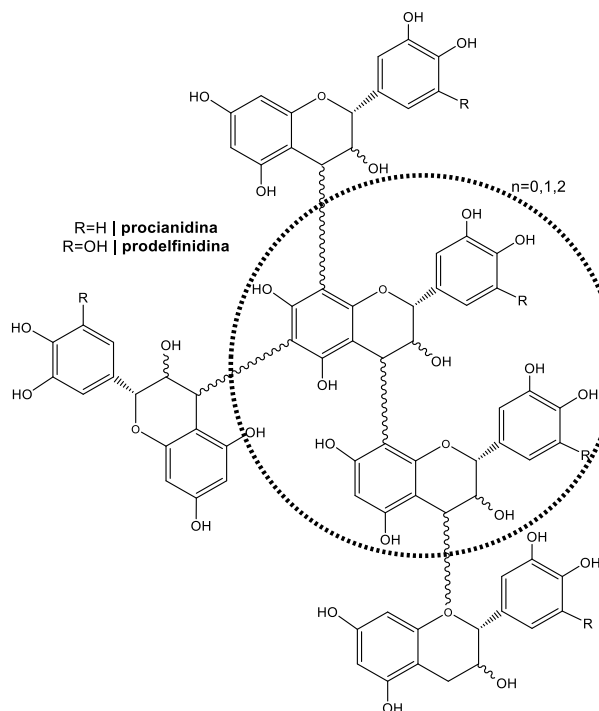
Figura 4. Estrutura base dos flavan-3-óis e exemplos de alguns compostos mais comuns.

1.2. Taninos

Os taninos são uma das classes de polifenóis mais complexa estruturalmente e geralmente apresentam alto peso molecular.^{2, 3} A designação de “tanino” advém da sua capacidade característica de interação com proteínas, induzindo a sua precipitação. Não existe um consenso geral para uma definição química específica, uma vez que esta classe apresenta uma grande heterogeneidade, mas geralmente a sua classificação é atribuída consoante a estrutura e propriedades típicas. Usualmente reconhece-se dois grupos de taninos: condensados ou proantocianidinas e hidrolisáveis (**Figura 5**). Enquanto os primeiros são constituídos por unidades básicas de flavan-3-ol (catequina, epicatequina), os taninos hidrolisáveis distinguem-se pela sua composição em ácidos gálicos (galhotaninos) ou ácidos elágicos (elagitaninos). De um modo geral, verifica-se que os

taninos hidrolisáveis apresentam um carácter mais hidrofóbico/apolar do que os condensados. Existe ainda outras classes minoritárias, como os florotaninos e os taninos complexos, encontrados em algas marinhas castanhas e pouco frequentemente integrados nas dietas humanas.^{1, 2}

A.



B.

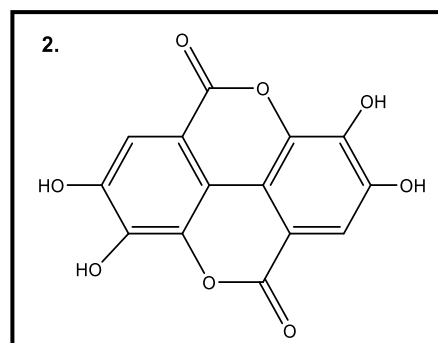
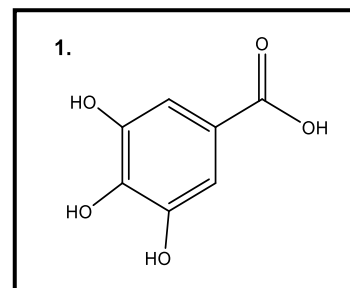


Figura 5. Estruturas químicas dos taninos. **A** | Estrutura geral das proantocianidinas **B** | Moléculas base dos taninos hidrolisáveis **1.** Ácido gálico **2.** Ácido elágico.

Os taninos são principalmente abundantes em bebidas como o vinho tinto, a cerveja, o café, o chá e sumos de frutas.^{17, 18} Ainda, podem ser encontrados numa grande multiplicidade de derivados de plantas, como raízes, cascas, sementes, grainhas, frutos (secos) e bagas.^{19, 20} A abundância relativa destes componentes varia conforme o tipo e fração da planta, assim como com as condições climáticas e geográficas.

À semelhança de outros compostos polifenólicos, os taninos foram também já associados a inúmeros benefícios para a saúde e, assim, a sua presença a nível alimentar apresenta uma grande relevância. A sua atual fama como importantes nutraceuticos é ainda pouco aceite por alguns investigadores, uma vez que podem apresentar alguns efeitos prejudiciais, como a redução da biodisponibilidade do ferro e de algumas proteínas, interferindo com a absorção intestinal.^{2, 3} Na verdade, estas características dos taninos são importantes nos mecanismos de defesa das plantas contra potenciais predadores, tornando-se estes potentes inibidores digestivos e tóxicos quando ingeridos em quantidades substanciais. Apesar de estarem muito associados à ideia de solubilidade,

os polímeros de taninos, compostos altamente hidroxilados, podem tornar-se insolúveis. Isto pode ficar a dever-se ao seu maior peso molecular, mas também ao seu possível envolvimento em complexações (não)-covalentes a matrizes de polissacáridos insolúveis das células vegetais.¹

1.2.1. Taninos condensados / proantocianidinas

A estrutura dos taninos condensados permite a formação de uma grande variedade de compostos, desde oligómeros a polímeros, com diferentes graus de substituição e polimerização. Foram já identificadas 15 subclasses de proantocianidinas, mas duas parecem apresentar uma maior relevância, devido à sua predominância nos alimentos de origem vegetal²¹: procianidinas e prodelfinidinas, dependendo se o anel B se encontra di-hidroxilado ou tri-hidroxilado, respetivamente (**Figura 5**). As unidades base das procianidinas correspondem à (+)-catequina e (-)-epicatequina, enquanto que as prodelfinidinas são formadas por galhocatequina e epigalhocatequina. Por um lado, estes monómeros podem estar ligados entre si somente por ligações flavânicas simples (ligações tipo B), fazendo-se estabelecer entre o carbono C4 de um flavanol e os carbonos C6 (C4→C6) e C8 (C4→C8) de outro (**Figura 6.B.**). Por outro lado, os polímeros de procianidinas podem ainda ser formados por ligações tipo A que consistem, para além da ligação C4→C8, numa ligação éter entre os grupos hidroxilo dos carbonos C5 ou C7 do anel A de um monómero e o carbono C2 do anel C de outro flavanol (C2→C7) (**Figura 6.A.**).^{1, 22}

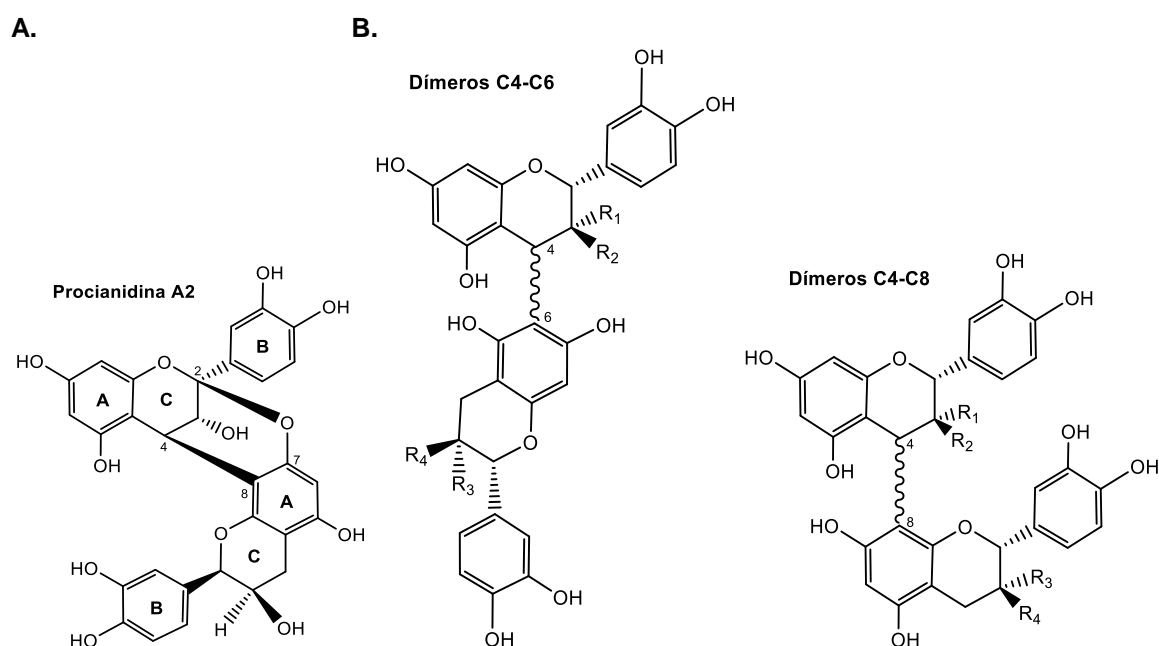


Figura 6. Estruturas químicas de algumas procianidinas diméricas com ligações **A** | tipo A, exemplificadas pela procianidina A2 e **B** | tipo B, correspondentes aos dímeros C4-C6 e C4-C8.

1.2.2. Taninos hidrolisáveis

A denominação de “hidrolisáveis” atribuída a este tipo de taninos advém da grande facilidade de clivagem das ligações éster por hidrólise que estes taninos possuem. Porém, estes compostos podem também possuir outro tipo de ligações (C-C, C-O-C) capazes de formar dímeros e outras estruturas mais complexas que aparentam ser mais resistentes a quebras químicas.²²

Como foi já referido, é possível distinguir dois tipos de taninos hidrolisáveis que se diferenciam pelas suas unidades monoméricas (ácido gálico ou ácido elágico). Ambos os tipos estão esterificados a um poliol, normalmente a glucose, por uma ligação éster. Os elagitaninos possuem a particularidade de serem compostos por unidades hexahidroxidifenol (HHDP), sendo que estas podem ser formadas a partir de duas unidades galhoilo dos galhotaninos. Ainda, reações sucessivas de oxidação levam à formação de unidades nonahidroxiterfenol (NHTP), presentes em algumas estruturas deste tipo de taninos (como a vescalagina e castalagina) (**Figura 7**).²³

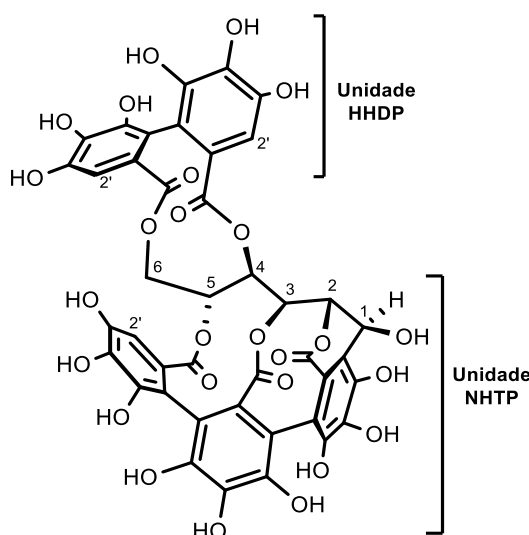


Figura 7. Unidades estruturais HHDP e NHTP características dos elagitaninos, presentes, neste caso, na estrutura química da vescalagina.

Os taninos hidrolisáveis encontram-se em menor quantidade na nossa dieta quando comparados com os condensados, principalmente por estarem mais presentes em regiões não comestíveis das plantas, como folhas, galhos e madeira.^{1, 24} Isto poderá justificar o facto de a sua influência na saúde ser menos abordada pelos investigadores. No entanto, muitas vezes estes compostos são introduzidos nos alimentos através de processamentos industriais. O caso mais comum é o do vinho tinto, em que durante o envelhecimento em barricas, os taninos hidrolisáveis provenientes da madeira do carvalho podem ser extraídos pelo próprio vinho.²⁵

1.2.3. Compostos *tannin-like*

Os “*tannin-like*” são polímeros derivados de flavan-3-óis, proantocianidinas e outros compostos polifenólicos, formados por transformação enzimática e/ou química durante o processamento de alguns alimentos (e.g. vinificação). No geral, possuem as mesmas características estruturais das classes de taninos supracitadas e também algumas das suas propriedades biológicas.²⁶ Estes compostos podem ser formados principalmente segundo duas vias de reação, sendo que uma delas consiste numa condensação mediada por acetaldeído (**Figura 8**).²⁷ Quando esta última situação ocorre entre flavonóides, formam-se polímeros ligados por pontes de etilo.²⁸ No entanto, este tipo de reação não é exclusivo dos flavan-3-óis, podendo também ocorrer entre eles e antocianinas ou apenas entre estes pigmentos.²⁹ No caso de se verificar a interação entre os dois tipos de polifenóis, podem formar-se aductos flavanol-antocianina e piranoantocianina-flavanol com pontes de etilo. A segunda via de reação é direta, não requerendo a presença de acetaldeído, e formam-se compostos de flavonóides e antocianinas.³⁰ Estudos mostraram que a presença de acetaldeído em soluções ricas em polifenóis promove a formação de grandes polímeros fenólicos capazes de precipitar em solução.^{31, 32} Ainda, verifica-se uma estabilização da cor das soluções provocada pelo aumento da polimerização das antocianinas com os taninos, num mecanismo descrito na secção 2. que se segue.

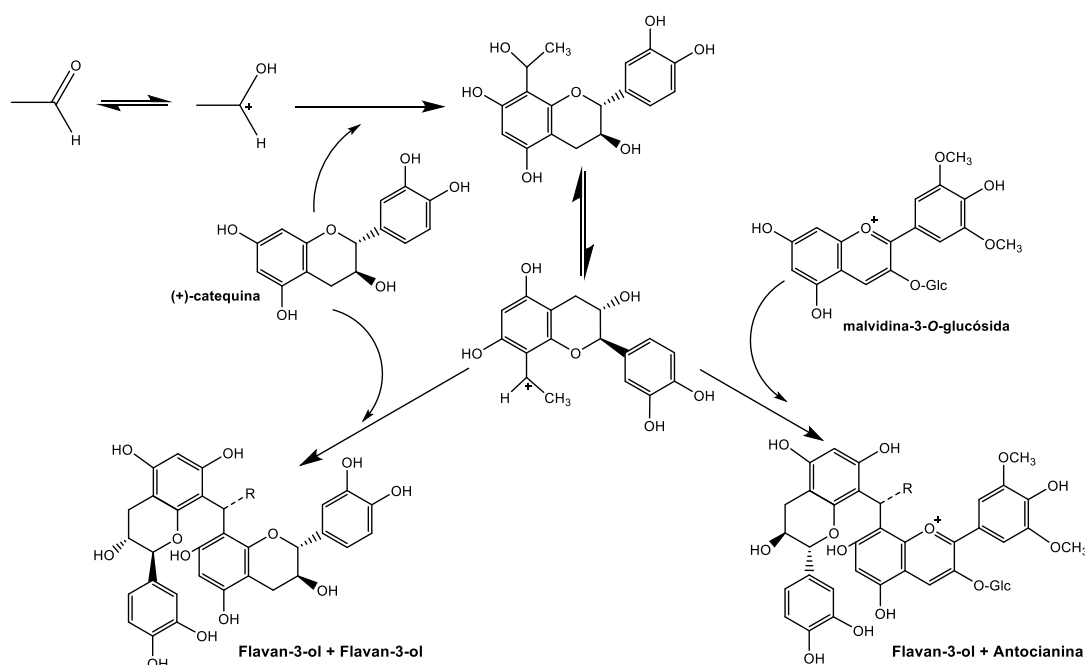


Figura 8. Mecanismo exemplificativo das reações de condensação mediadas por acetaldeído que levam à formação de compostos *tannin-like*, neste caso entre flavan-3-óis e antocianinas. Adaptado de Es-Safi, N. *et al.* (2002)

2. Copigmentação

A copigmentação é um processo espontâneo e exotérmico, caracterizando-se por um desvio/aumento do comprimento de onda de absorvância máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) na zona visível do espectro do complexo (antocianina+copigmento) em comparação com a antocianina livre.³³ A valores de pH pouco ácidos (4-6), verifica-se que soluções de antocianinas puras apresentam uma coloração muito fraca ou praticamente incolor. No entanto, quando nas mesmas condições, mas na presença de outros compostos, como acontece no vinho tinto, estes pigmentos manifestam uma grande variação de cores intensas características. Estas observações podem ser descritas, por um lado, pelo fenómeno de copigmentação,³⁴ no qual as antocianinas emparelham com outras molécula(s) orgânica(s) e há uma estabilização da cor, ou, por outro lado, por interação com metais. As referidas moléculas, vulgarmente denominadas de “copigmentos”, são usualmente incolores com um sistema- π rico em eletrões, sendo que os exemplos mais comuns incluem os flavonóides, alcaloides, aminoácidos, ácidos orgânicos e polissacáridos. Este processo pode ocorrer por interação entre diferentes moléculas de antocianinas e copigmentos (intermolecular), entre as várias moléculas de antocianinas (auto-associação)³⁵ ou ainda por interações intramoleculares³⁶, onde o copigmento faz parte da própria molécula de antocianina (**Figura 9**).¹² As ligações mais importantes envolvidas na formação destes complexos antocianina-copigmento incluem as pontes de hidrogénio, as interações hidrofóbicas e π - π .³⁷

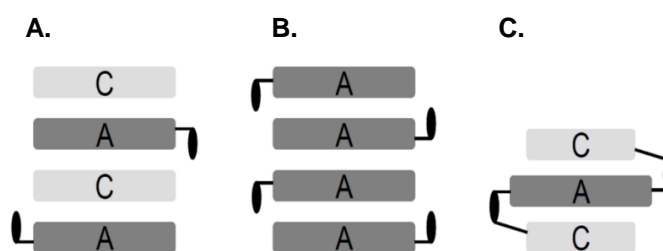


Figura 9. Esquemas dos diferentes tipos de copigmentação. **A** | Copigmentação Intermolecular, **B** | Auto-associação e **C** | Copigmentação Intramolecular. Adaptado de Maite, T. *et al.* (2012)

A copigmentação depende do tipo e concentração das antocianinas e copigmentos envolventes, bem como do pH, temperatura e solvente.³⁸ Condições mais extremas, como o aumento da temperatura e da força iónica, podem levar ao enfraquecimento do efeito do copigmento e à quebra destes complexos, debilitando a estabilização da cor das soluções. A água é também um fator crucial neste processo devido à sua estrutura molecular e às interações que potencia.³⁹ Assim, a presença de outros solventes poderá diminuir o efeito por interferirem com o estabelecimento das interações referidas

anteriormente.⁴⁰ Este fenómeno representa um grande foco de interesse na indústria, uma vez que potencia e estabiliza o tão valorizado carácter corante associado aos pigmentos naturais das plantas.

3. Saliva

A saliva é um importante lubrificador da boca, participando na moldagem da comida para posterior digestão e também na perceção do sabor dos alimentos. Além disto, é responsável por manter o pH da cavidade oral, atua como agente antifúngico e antiviral e ainda ajuda a neutralizar o refluxo ácido no esófago.⁴¹

Mais concretamente, a saliva é um fluído aquoso, constituído por 99% de água e formado na boca pelo fluído crevicular, bactérias, detritos celulares e excreções das glândulas salivares maiores e menores. É composta por uma variada mistura de compostos orgânicos e inorgânicos, incluindo eletrólitos, imunoglobulinas e proteínas, entre as quais algumas enzimas (lípsases, glicosidases e proteases).^{42, 43} A excreção de saliva é controlada pelo sistema nervoso autónomo (sistemas simpático e parassimpático) e por sistemas de transdução de sinal que acoplam a estimulação de recetores aos mecanismos de transporte de iões e excreção de proteínas. Dependendo da idade, género, dieta, ritmos circadianos, presença ou ausência de doenças e agentes farmacológicos, a composição da saliva pode ser a mais variada. Para além disso, o volume de saliva produzido está dependente da presença de estimulação (saliva estimulada), como a ingestão de alimentos, sendo que a contribuição das diferentes glândulas salivares para a constituição da saliva também depende deste fator.⁴⁴ Por exemplo, a glândula parótida contribui mais para uma saliva estimulada, diminuindo a sua viscosidade e aumentando o teor de proteínas ricas em prolina (PRPs).⁴⁵ Em condições de repouso (saliva não estimulada), as contribuições relativas das glândulas salivares maiores correspondem geralmente a 69% submandibular, 26% parótida e 5% sublingual. Nestas circunstâncias, um fluxo considerado normal apresenta valores da ordem dos 0,2 mL.min⁻¹, mas estes podem aumentar para mais do dobro quando sob estimulação.⁴² A estimulação por ingestão de bebidas e alimentos pode também influenciar o pH normal de 6-7 da saliva,⁴⁶ podendo diminuir estes valores consideravelmente até próximo de 4,0.^{47, 48}

3.1. Proteínas salivares (PS)

Até 2015, foram já identificadas mais de 3000 proteínas na saliva humana.⁴⁹ Esta grande diversidade proteómica e os diferentes fatores intrínsecos e extrínsecos referidos anteriormente que fazem variar a composição da saliva refletem-se muitas vezes na

formação de salivas muito distintas.^{44, 50} Para além disto, os ritmos circadianos parecem ser também de grande importância no que diz respeito aos níveis das diferentes proteínas salivares (PS) durante o dia. Um estudo revelou que se atinge um pico máximo de algumas PS na saliva por volta das 14h.⁴⁵ Porém, o modo como estas diferenças ocorrem ao longo do tempo é ainda pouco compreendido.

As famílias de proteínas mais importantes até agora identificadas na saliva incluem as PRPs, estaterina, péptido P-B, cistatinas, histatinas e mucinas (**Figura 10**).^{51, 52} A saliva não estimulada apresenta uma maior quantidade de histatinas por estas serem produzidas tanto pela glândula submandibular como pela parótida, contrastando com as PRPs que parecem contribuir mais para uma saliva estimulada, onde as excreções da parótida predominam.⁵³ De entre as enzimas mais comuns na saliva, a α -amilase é a maior (60kDa) e mais abundante, representando cerca de 30% do total de proteínas.⁵⁴ Esta proteína globular tem como função primordial catalisar a hidrólise do amido, mas também participa na formação do esmalte, cáries e placa bacteriana por ligar alguns tipos de bactérias.⁵⁵

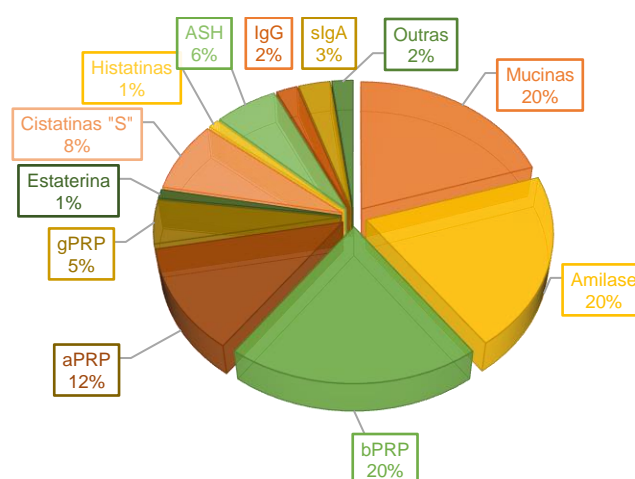


Figura 10. Percentagens aproximadas das principais classes de proteínas e peptídeos salivares encontrados na saliva. aPRPs, proteínas ricas em prolina ácidas; ASH, albumina de soro humano; bPRPs, proteínas ricas em prolina básicas; gPRPs, proteínas ricas em prolina glicosiladas; IgG, imunoglobulina G; slgA, imunoglobulina A secretora. Adaptado de Messana, I. *et al.* (2008).

3.1.1. Proteínas ricas em prolina (PRPs)

As proteínas mais abundantes na saliva, representando cerca de 70% de todas as PS, são as PRPs. Este nome advém da sua sequência de aminoácidos característica abundante em prolina, um resíduo pouco comum em proteínas biológicas. Estas PS apresentam uma conformação aberta e possuem aproximadamente 19 resíduos de prolina (25-42%), glicina (16-22%) e glutamina (15-28%) repetidos entre 5 a 15 vezes.^{42,}

⁵⁶ Estas PS são classificadas como proteínas intrinsecamente desestruturadas

(*intrinsically unstructured proteins*), porque, apesar de serem funcionais, não possuem uma estrutura terciária estável.⁵⁷

As PRPs são segregadas pelas glândulas submandibular e parótida e contribuem para a homeostasia do cálcio na cavidade oral. Podem ser divididas em PRPs básicas (bPRPs), glicosiladas (gPRPs) e acídicas (aPRPs), conforme a sua carga e a presença/ausência de carboidratos. As duas primeiras constituem o grupo mais complexo, sendo expressas por 4 genes diferentes, PRB1, 2, 3 e 4, do cromossoma 12p13.2. Mais de 11 isoformas de bPRPs⁵⁸ humanas e 5 de aPRPs⁵⁹ foram já identificadas. Apesar de não se registarem evidências claras das funções de cada tipo de PRPs, estas possuem algumas particularidades que permite distingui-las.

Contrariamente ao que acontece com as aPRPs, as bPRPs são fragmentos peptídicos resultantes de proteínas de maiores dimensões. Devido à grande complexidade desta família de PS, e apesar de algumas estruturas terem sido já caracterizadas, muitas carecem de mais informações. Apresentam um ponto isoelétrico (pI) bastante elevado (>9) quando comparando com as aPRPs, devido principalmente ao facto de possuírem resíduos que são pouco ionizados a pH básico ou neutro. Tem sido aceite que as bPRPs estão de algum modo associadas à proteção contra os efeitos nefastos dos taninos no trato gastrointestinal, uma vez que apresentam uma grande capacidade de ligação a estes compostos.⁵⁸ Aliás, estas PS são extensamente descritas na literatura⁶⁰ como as que possuem maior afinidade para os taninos dos alimentos. Ainda, parecem estar também relacionadas com ligação a bactérias e apresentam atividade antiviral.⁴³

As gPRPs são bPRPs que podem apresentar 50% da sua estrutura *N*- ou *O*-glicosilada nos resíduos de arginina, treonina e serina.⁶¹ Apesar de ser muito característico das gPRPs, tanto as aPRPs como as bPRPs também podem apresentar algum nível de glicosilação. As funções mais comumente associadas às gPRPs são, juntamente com as mucinas, a lubrificação da cavidade oral e a prevenção da aglutinação bacteriana.⁴³ Esta capacidade lubrificante das gPRPs é dependente não só do tipo de carboidratos, mas também da extensão da glicosilação.⁶²

O carácter ácido das aPRPs (baixo pI) é conferido pela presença de resíduos de ácido aspártico e glutâmico na sua composição, principalmente na região *N*-terminal. Ainda a nível estrutural, possuem alguns grupos fosfato (Ser 8, 17 e 22) e a sua região *C*-terminal é semelhante à das bPRPs.⁶³ Para além de estarem envolvidas na manutenção dos níveis de cálcio, participam também na ligação de bactérias à cavidade oral. A capacidade destas proteínas interagirem com diferentes compostos polifenólicos foi

também já muito abordada, sendo que vários estudos defendem a sua maior afinidade comparativamente com as bPRPs.^{51, 64, 65}

3.1.2. Estaterina

A estaterina é um pequeno péptido (5232 Da), fosforilado nos resíduos Ser-2 e Ser-3 e constituído por um *N*-terminal muito ácido.⁶⁶ O gene responsável pela sua expressão é o *STATH*, que se encontra no cromossoma 4q13.3.⁶⁷ É segregada pela glândula parótida e dos 43 aminoácidos que a constituem, os resíduos de tirosina são os mais abundantes, apresentando várias isoformas. Assim como as PRPs, a estaterina é responsável pela manutenção da supersaturação do cálcio iónico e protege, assim, os dentes da desmineralização. É graças à região *N*-terminal muito negativa da estaterina que esta ligação ao cálcio se estabelece, apesar de estar dependente também do nível de fosforilação da PS. Ainda, em coordenação com as PRPs, esta proteína permite a ligação de muitos microrganismos aos dentes e a outras superfícies da cavidade oral.^{44,}

⁶⁶

3.1.3. Péptido P-B

Apesar de muitas vezes o péptido P-B (5792 Da) ser incluído na família das bPRPs devido ao seu alto teor em resíduos de prolina (quase 50% da sua sequência total), este apresenta maiores similaridades com a estaterina. Estas duas PS têm em comum algumas sequências *consensus*, e para além disso o péptido P-B é um produto de um gene específico muito próximo do gene *STATH*, o gene *PROL3*, ao contrário das bPRPs (genes *PRB1-4*). Para além disso, o péptido P-B é uma proteína madura em si, e não um produto resultante da degradação de outras proteínas maiores. A maior distinção relativa ao péptido P-B verifica-se a nível estrutural, no sentido em que este apresenta vários resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, como a fenilalanina, leucina e isoleucina, e três resíduos de tirosina.^{58, 68}

3.1.4. Cistatinas

As cistatinas são pequenas proteínas estruturadas com pesos moleculares entre 13 e 14 kDa e possuem duas pontes dissulfeto. O seu nome advém do facto de serem inibidores endógenos de proteases de cisteína. As cistatinas mais abundantes na saliva humana são as cistatinas S1 e SN. Apresentam um papel de proteção dos tecidos contra a degradação por atividade proteolítica e também demonstram alguma atividade antimicrobiana.⁶⁹

3.1.5. Outras PS

As histatinas são pequenos péptidos ricos em resíduos de histidina (18-29%). Foram já identificadas e isoladas 12 histatinas que apenas se encontram na saliva, dentro das quais as HRP1, 3 e 5 são as mais predominantes. Esta família de PS participa na proteção da cavidade oral, na formação do esmalte dos dentes e também atua como agente antimicrobiano e antifúngico. Por serem facilmente degradadas, a sua abundância na saliva total é menor do que quando comparada nas excreções diretas das glândulas submandibular e parótida.⁷⁰

As principais PS segregadas pela glândula submandibular e em parte também pela glândula parótida são as mucinas, em especial a MG1 (> 1MDa) e a MG2 (200-250 kDa).¹ Estas glicoproteínas, pouco solúveis, são responsáveis pelas propriedades viscoelásticas da saliva, sendo que quanto maior for a sua abundância, mais viscosa será a saliva. Ainda, e assim como as histatinas, apresentam um importante papel antifúngico.⁴⁴

4. Interação polifenóis-proteínas

Dos compostos que constituem a grande família dos polifenóis, os taninos são os mais descritos na literatura⁷¹⁻⁷³ no que diz respeito à capacidade de se comportarem como ligandos multidentados. Estes interagem, entre outros, com diversos locais das estruturas de diferentes proteínas (PRPs,⁵¹ caseína,⁷⁴ gelatina,²⁴ BSA, α -amilase,⁵⁴ hemoglobina,⁷⁵ histatinas,⁵³ mucinas,⁷⁶ etc.). Em particular, as interações que estabelecem com proteínas biológicas, como as PS, apresentam um especial interesse na área da saúde.

4.1. Considerações gerais

Apesar de este ser um tópico vastamente estudado, os fatores que influenciam as interações entre polifenóis e proteínas são vários e, portanto, dificultam a tarefa de caracterização e generalização das diferentes interações. A referida variabilidade não depende apenas das características específicas das duas espécies intervenientes, mas também do meio e condições em que estas se encontram. Mais concretamente, os fatores que parecem interferir na interação polifenóis-proteínas incluem as estruturas, pesos moleculares, rácios molares e concentrações das duas espécies, assim como o pH, a força iónica, o tipo de iões, a temperatura, entre outros.¹ O pH do meio influencia o grau de ionização das duas espécies e, consequentemente, as repulsões eletrostáticas entre elas.⁷⁷

No que diz respeito às proteínas, o seu tamanho, carga, tipo de cadeias laterais e conformação são das características que mais influenciam a sua capacidade de interação com os taninos.¹ Em condições semelhantes, verifica-se que proteínas maiores, mais

globulares e estruturadas apresentam maior resistência para estabelecer interações do que proteínas com uma estrutura mais aberta,⁷⁸ devido sobretudo à menor acessibilidade dos aminoácidos hidrofóbicos no primeiro caso. As PRPs parecem ser as que têm maior afinidade, uma vez que as características estruturais únicas do aminoácido prolina representam importantes locais de ligação (interações hidrofóbicas e aceitador de pontes de hidrogénio). Mais precisamente, a sua forma planar rígida e a sua superfície hidrofóbica permitem estabelecer interações de *stacking* com outras superfícies hidrofóbicas, como é o caso dos anéis aromáticos dos polifenóis.^{78, 79} Para além da estrutura intrínseca deste aminoácido ser favorável à interação, a presença de resíduos de prolina promove o alongamento e abertura da estrutura polipeptídica e, assim, maximiza a superfície de ligação das proteínas disponível para interação.⁸⁰ Ainda, como os resíduos de prolina são incapazes de formar pontes de hidrogénio intra- e intermoleculares com os átomos de oxigénio das ligações peptídicas,⁸¹ estes átomos tornam-se mais desimpedidos para estabelecerem pontes de hidrogénio com os grupos hidroxilo dos polifenóis. Generalizando, proteínas ricas em prolina tendem a ter uma maior exposição dos seus resíduos hidrofóbicos do que dos resíduos hidrofílicos.⁸² Do mesmo modo, a glicosilação das proteínas parece também influenciar a sua capacidade de interação, uma vez que, à semelhança dos resíduos de prolina, providencia uma conformação mais aberta.⁵⁶

Relativamente aos polifenóis, a sua capacidade de interação depende diretamente da estrutura, em particular do tamanho, conformação, flexibilidade, grau de hidroxilação, presença de grupos galhoilo, entre outros. De um modo geral, verifica-se o mesmo que para as proteínas em termos de peso molecular, ou seja, quanto maior o tamanho e, consequentemente, o número de locais de ligação, maior a afinidade.^{78, 80} Igualmente, compreende-se também que um maior grau de hidroxilação amplifica o número de interações possíveis, promovendo a formação de ligações polifenol-proteína.⁸³ Por outro lado, alguns polifenóis são ainda capazes de realizar auto-associação pelo empilhamento π - π dos seus anéis aromáticos e este processo compromete a disponibilidade dos locais de ligação passíveis de interagir com as proteínas.^{80, 84} Assim, polifenóis mais polimerizados que exibam uma conformação mais rígida, apesar de possuírem grandes dimensões, podem apresentar maiores restrições na interação quando comparados com compostos mais flexíveis.⁷ Do mesmo modo, o aumento do grau de galhoilação parece também promover a interação, uma vez que a maior presença de anéis aromáticos e grupos hidroxilo permite estabelecer um maior número de pontes de hidrogénio e interações hidrofóbicas.^{54, 75} Contudo, é de ressaltar que estas relações dependem das características estruturais das proteínas com que estes polifenóis interagem.

De um modo geral, verifica-se que os taninos hidrolisáveis parecem interagir mais com proteínas do que os taninos condensados, não sendo estritamente necessário registar-se precipitação. Esta maior capacidade de interação inerente aos taninos hidrolisáveis estará provavelmente relacionada com o seu maior carácter apolar, favorecendo as ligações hidrofóbicas muito comuns nas interações polifenóis-proteínas.¹

24, 64

4.1.1. Tipo de interações

As ligações estabelecidas entre os polifenóis e os vários epítomos de ligação de uma ou mais moléculas de proteína (ligações cruzadas) envolvem diferentes tipos de ligações químicas, sendo estas mais ou menos importantes para a força da interação estabelecida. As mais relevantes incluem ligações não-covalentes, como as interações hidrofílicas (pontes de hidrogénio) entre os grupos hidroxilo dos polifenóis e os grupos carbonilo/amina das proteínas e as interações hidrofóbicas entre os anéis benzénicos dos polifenóis e os aminoácidos apolares das cadeias laterais das proteínas.^{1, 85} Porém, também já foram reportadas ligações covalentes (irreversíveis) a pH alto, e ligações iónicas, embora menos comuns, porque os polifenóis são ácidos fracos (pKa de 9-10) e não apresentam carga a pH ácido ou neutro.⁸⁶

Apesar de não haver evidências claras de qual a contribuição relativa de cada tipo de interação, há indícios de uma cooperatividade entre si de modo a fortalecerem-se mutuamente. Não existe um único tipo de interações a contribuir para a formação dos complexos polifenóis-proteínas, mas dependendo das espécies intervenientes parece haver uma predominância relativa. Enquanto que no caso dos flavan-3-óis de baixo peso molecular as interações que estabelecem com algumas proteínas aparentarem ser preferencialmente pontes de hidrogénio, os taninos condensados parecem privilegiar as interações hidrofóbicas. Assim, no mecanismo que melhor traduz as interações polifenóis-proteínas, verifica-se que as interações hidrofóbicas são as primeiras a ser estabelecidas⁸⁰ e posteriormente as pontes de hidrogénio contribuem para a estabilização dos complexos.^{86, 87} Por oposição, outros artigos apresentam resultados que privilegiam as pontes de hidrogénio em alternativa às interações hidrofóbicas, mas as condições em que estes complexos foram estudadas diferem.⁸⁸ Assume-se, de um modo geral, que a polaridade dos polifenóis envolvidos é o fator que melhor poderá prever o tipo de associação (pontes de hidrogénio e interações hidrofóbicas) estabelecida com as proteínas, sendo que polifenóis mais apolares favorecem as interações hidrofóbicas e os mais polares as pontes de hidrogénio.⁸⁹

4.1.2. Modelos moleculares

Ao longo dos anos, foram surgindo alguns modelos moleculares com o intuito de descrever este tipo de interações^{87, 90-92}. Apesar de estes diferirem em alguns aspetos e não haver uma uniformização em relação a um modelo único, todos parecem entrar em consenso no facto de a estequiometria e o tamanho dos complexos formados dependerem das concentrações relativas de cada espécie, bem como dos rácios polifenol/proteína.

Um dos primeiros modelos (1981)⁹⁰ descreve a interação entre compostos fenólicos simples e uma proteína modelo, a albumina de soro bovino (BSA). McManus e seus colaboradores propuseram que a precipitação da BSA pelos polifenóis é dependente do pH e que este processo pode ser revertido com a adição de mais proteína. De um modo geral, o processo é descrito por uma fase inicial em que, a baixas concentrações de proteína, o polifenol se associa a um ou mais locais, formando uma monocamada menos hidrofílica que a proteína sozinha. Com o aumento da concentração de BSA, ocorrem ligações cruzadas com os polifenóis multidentados, intensificando a sua complexação. Isto traduz-se num aumento da agregação do complexo até se atingir um limite a partir do qual não se verifica mais precipitação. No entanto, os autores sugeriram que poderá haver alguma reversibilidade do processo se a adição das espécies for mantida.

Mais tarde (1996)⁹¹, com o intuito de descrever o processo de turbidez da cerveja, Siebert e seus colegas propuseram um modelo capaz de corroborar uma teoria defendida anteriormente.⁹³ Neste caso, os autores propõem que o aumento da concentração de polifenol, para uma quantidade fixa de proteína, permite alcançar um patamar ótimo de máxima precipitação e para rácios polifenol/proteína superiores ou inferiores a este os complexos formados diminuem (**Figura 11.A.**). O alcance do mesmo *plateau* também se verifica para a situação inversa, ou seja, no caso de a quantidade de polifenol ser fixada e os níveis de proteína aumentarem. Mais concretamente, considerando que cada molécula de polifenol e proteína apresenta um número fixo de locais de ligação capazes de interagir entre si, a maior interação possível alcançar-se-á quando o número de locais de ligação de cada espécie se iguala (**Figura 11.B.**). No caso de haver um excesso de proteína, assume-se que a capacidade dos polifenóis estabelecerem pontes cruzadas entre diversas moléculas proteicas será insuficiente para se atingir o *plateau*. Deste modo, a formação de dímeros proteicos e agregados mais pequenos será privilegiada. Na situação contrária, em que se verifica uma maior concentração de polifenóis em vez de proteína, os locais de ligação desta última estarão saturados e, portanto, o número de ligações cruzadas estabelecidas pelos polifenóis será também limitado. Este modelo sugere, assim, que a máxima interação possível de se alcançar, que neste caso se traduz

na turbidez, está relacionada com a estequiometria dos complexos e da concentração relativa de cada espécie. Em 1987, Hagerman e seus colegas sugeriram uma hipótese capaz de explicar este modelo, onde descreveram o comportamento hiperbólico entre as concentrações das duas espécies passíveis de interagir com a capacidade de formar agregados, estando a capacidade de interação dependente deste fator estequiométrico.⁹³

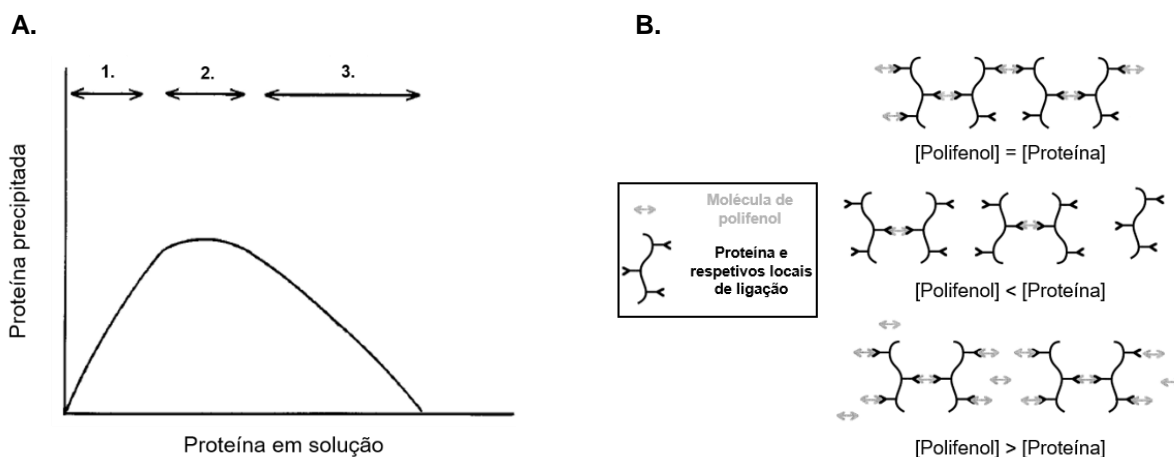


Figura 11. Mecanismo molecular proposto para a interação entre polifenóis e proteínas. **A** | Curva de nefelometria representativa da concentração de uma proteína numa mistura com uma concentração fixa de polifenóis. 1. Excesso de polifenol; 2. *Plateau*; 3. Excesso de proteína. Adaptado de Hagerman, A. *et al.* (1987). **B** | Modelo proposto para interação entre polifenóis com duas extremidades representativas e proteínas com respectivos locais de ligação. Adaptado de Siebert, K. J. *et al.* (1996)

Porém, estes modelos continuavam a ser pouco realistas para alguns tipos de proteínas, como é o caso das PRPs, por não traduzirem o comportamento peculiar destas proteínas pouco estruturadas. Assim, mais tarde (2002)⁸⁷ surgiu uma teoria alternativa com vista a descrever melhor estas situações em que a reversibilidade da precipitação dos complexos polifenol-proteína não se verifica. Nestes casos, e considerando a alta afinidade polifenóis-PRPs, independentemente das adições sucessivas de proteína a uma dada quantidade de polifenol, os complexos insolúveis já formados permanecem inalteráveis. Charlton e seus colaboradores sugeriram um modelo em que a interação entre polifenóis e proteínas ocorre segundo um mecanismo de três passos, o que foi confirmado em estudos posteriores (**Figura 12**).⁹² Inicialmente, a conformação aberta da proteína é alterada para uma estruturação mais enrolada e compactada como resultado da ligação sucessiva dos polifenóis multidentados a vários locais da mesma proteína. No segundo passo, e à medida que a concentração de polifenóis aumenta, estes estabelecem ligações cruzadas com diferentes moléculas proteicas até se formarem complexos insolúveis. No passo final, em que cada vez mais moléculas são adicionadas e mais ligações são estabelecidas, o complexo agrega-se em partículas que precipitam na solução. Assim, verifica-se também neste caso que há um rácio ótimo polifenol-proteína

para o qual a precipitação é máxima, correspondendo ao ponto em que o número de locais de ligação dos polifenóis e das proteínas se iguala.

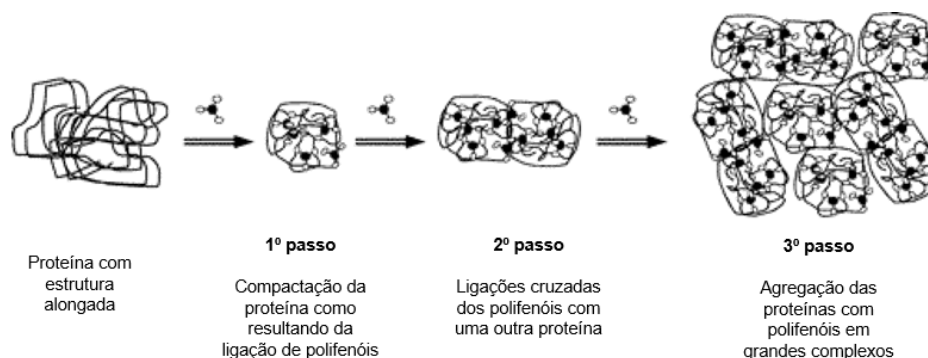


Figura 12. Modelo molecular de ligação proposto para a interação entre polifenóis e proteínas. No **1º passo**, os polifenóis ligados à proteína em vários locais induzem a sua compactação; no **2º passo**, os polifenóis estabelecem ligações cruzadas com outras moléculas de proteína e formam-se complexos insolúveis; no **3º passo**, o agregado final mais complexo precipita. Adaptado de Jöbstl, E. *et al.* (2004)

4.2. Interação polifenóis-proteínas salivares

A função das PS como primeira linha de defesa do organismo contra possíveis agentes prejudiciais encontra-se bem descrito na literatura.⁹⁴ No caso particular dos polifenóis, as PS são capazes de interagir em especial com os taninos, formando complexos (in)solúveis. Deste modo, as PS conseguem diminuir os possíveis efeitos anti-nutricionais destes compostos fenólicos, prevenindo a sua potencial atividade pejorativa nos sistemas biológicos.⁹⁵ Por outro lado, esta interação pode também ter efeitos adversos associados, uma vez que os polifenóis, ao interagirem com as PS, podem deixar de ser absorvidos no trato gastrointestinal e consequentemente deixarem de exercer as suas atividades benéficas.⁹⁶ Estudos revelaram que as interações entre alguns polifenóis e proteínas afetam a capacidade antioxidante dos primeiros, sendo assim de esperar que o mesmo aconteça no caso das PS.⁹⁷ Em alternativa, também já se verificou que outras proteínas auxiliam o seu transporte pelo organismo de modo a atingir os diferentes órgãos e aí exercer a sua ação benéfica.⁹⁸ Tendo isto em conta, coloca-se em questão o efeito real *in vivo* benéfico dos compostos polifenólicos e se a sua interação com as PS interfere na biodisponibilidade de ambas as espécies.

À semelhança do que foi referido anteriormente para as proteínas no geral, as interações que as PS estabelecem depende também das suas especificidades e das características dos polifenóis com que interagem. Em termos estruturais, o número e a posição dos grupos hidroxilo dos flavan-3-óis são fatores críticos para a sua capacidade de interagir com PS.⁹⁹ Um estudo envolvendo a análise comparativa de proantocianidinas mostrou que os dímeros que possuem ligações interflavânicas C4→C8 (dímeros B3 e B4)

apresentam uma maior afinidade do que os seus análogos com ligações C4→C6 (dímeros B6 e B8). Isto estará provavelmente relacionado com as restrições conformacionais conferidas neste último tipo de ligações.¹⁰⁰ Existem evidências que parecem favorecer polifenóis maiores e mais hidrofóbicos na interação com proteínas ricas em prolina, principalmente pelo seu maior carácter multidentado.^{54, 80} Para além da mais conhecida interação entre os anéis pirrólicos da prolina e aromáticos dos polifenóis, os anéis imidazol dos resíduos de histidina das histatinas parecem ser também relevantes nestas interações de *stacking*.⁵³

Os fatores externos afetam igualmente a interação particular taninos-PS, como em todas as interações polifenóis-proteínas. Foi demonstrado que o pH é algo determinante, tendo-se verificado que a pH 5,0, um valor intermediário entre o pH do vinho (3,4) e a saliva (7,0), as proteínas estão mais estáveis e a interação é muito intensa.¹⁰¹

Estudos mais recentes mostraram uma preferência relativa da ordem de precipitação das diferentes proteínas que constituem a saliva total quando estas estão em competição e em contacto com algumas proantocianidinas, sendo que as primeiras a interagir são as aPRPs e a estaterina, seguindo-se as histatinas, as gPRPs e por fim as bPRPs.⁵¹ Ainda, o grau de glicosilação é importante para a capacidade das proteínas de agregar taninos.⁵⁶ Estudos revelaram que o aumento dos grupos glicosilo, por um lado, favorece a interação em parte por aumentar a superfície de contacto da proteína, e por outro, promover a solubilidade dos complexos formados.^{60, 102}

4.2.1. Adstringência

A adstringência resulta da ingestão de compostos ditos “adstringentes”, encontrados em muitos alimentos derivados de plantas, especialmente frutos pouco maduros, e bebidas, como o chá, café, vinho e sumos de frutas.^{72, 103} Os polifenóis, mais precisamente os taninos, vários sais de catiões multivalentes, agentes desidratantes (álcool e acetona) e ácidos fazem parte deste grupo de moléculas adstringentes.¹⁰⁴ Inicialmente, logo após a ingestão dos compostos adstringentes, esta sensação pode ser muito subtil e demorar um pouco até ser totalmente percecionada (15 segundos), mas a exposição repetida a estes agentes poderá intensificar as sensações que se desencadeiam na boca.¹⁰⁵ Aliás, sabe-se que a exposição repetitiva ao ácido tânico (composto adstringente) leva a um aumento da duração da adstringência, mas o máximo de intensidade e o tempo que decorre até atingir esse máximo não são alterados.¹⁰⁶

Apesar do conceito de adstringência ser ainda alvo de muito debate, os mais recentes estudos definem este fenómeno como um conjunto de sensações tácteis.¹⁰⁴ Uma vez que a adstringência é descrita pelo desenvolvimento de constrição, aspereza, secura

e rugosidade da cavidade oral, a associação deste mecanismo a uma sensação gustativa¹⁰⁷ tem vindo a cair em desuso. Ainda, esta hipótese pode ser também refutada pelo facto de a adstringência ser sentida em algumas regiões da boca que não possuem recetores de sabor.^{104, 108} A existência ou ativação de recetores que reconheçam compostos adstringentes ainda não foi também totalmente elucidada, ficando por esclarecer se o processo envolve quimio- e/ou mecanoceção.¹⁰⁹ No entanto, sabe-se que a diminuição da lubrificação e consequente fricção da mucosa é um fator muito associado ao fenómeno de adstringência e isto pode levar à ativação de mecanorecetores.¹¹⁰⁻¹¹² A acrescentar à complexidade deste fenómeno, e apesar de terem origem noutros mecanismos, o amargor e a acidez são também sensações que comumente acompanham a adstringência, tornando a sua perceção ainda mais confusa.^{105, 113} Por tudo isto, é de esperar que a adstringência desencadeada por alimentos ricos em taninos seja associada a um aspeto negativo. No entanto, níveis moderados de adstringência em algumas bebidas, como o chá verde/preto, o vinho tinto ou a cerveja, é desejado pelos consumidores, pois estão associados quer ao sabor, quer à qualidade destes produtos.

Os mecanismos molecular e fisiológico pelos quais este fenómeno se desenvolve não estão também completamente esclarecidos pela complexidade de variantes e fatores envolvidos. A palavra “adstringência” advém do Latim “*ad stringere*” que significa “ligar”, o qual parece ser o principal processo bioquímico associado a este conjunto de sensações.¹⁰⁴ O mecanismo mais aceite baseia-se na interação entre os polifenóis da dieta e as proteínas salivares, resultando na formação de agregados (in)solúveis.^{114, 115} Assim, assume-se que a capacidade dos polifenóis interagirem com as proteínas será proporcional à adstringência, sendo que os mesmos fatores que interferem na formação dos agregados influenciam também este processo. De um modo geral, a interação dos taninos com as proteínas salivares induz a precipitação destas últimas, reduzindo a lubrificação da cavidade oral e aumentando a fricção da sua superfície, estimulando assim os mecanorecetores aí existentes.¹¹⁶ Resultante da falta de lubrificação, pela precipitação das mucinas,^{76, 104} há uma maior constrição dos tecidos e a sensação de rugosidade e aspereza aumenta.¹ A perceção da adstringência está diretamente relacionada com as características estruturais dos taninos, sendo que moléculas de maiores dimensões e mais polimerizadas estão normalmente associadas a uma maior adstringência, por proporcionarem mais pontos de interação com as proteínas e assim promover a sua precipitação.^{72, 113} Curiosamente, a (-)-epicatequina é percecionada como mais adstringente do que a (+)-catequina.^{117, 118} Tendo em conta que a (-)-epicatequina apresenta uma conformação mais planar ao nível do anel C e, sabendo que esta estrutura é favorável à formação de interações, compreende-se que o fenómeno de adstringência

seja promovido. Relativamente às PS, estudos com diferentes famílias revelaram ainda que estas podem estar envolvidas em diferentes fases do desenvolvimento da adstringência.⁵¹ O pH e a sacarose são outros dois fatores que podem influenciar a percepção da adstringência, sendo que a última induz uma redução desta sensação.^{106, 112} Mais recentemente,^{119, 120} foi também demonstrado que as células orais humanas ligam os complexos taninos-PS e, conseqüentemente, podem contribuir para a percepção da adstringência. Ainda, o volume e o fluxo da saliva parecem ser também influenciados pela presença de agentes adstringentes.¹²¹

A precipitação das PS, em especial das PRPs, quando em interação com polifenóis encontra-se muito descrita como a base do desenvolvimento da adstringência.^{92, 115} Porém, grande parte destes estudos são realizados *in vitro* e recorrem a proteínas-modelo (e.g. gelatina, caseína, BSA) em alternativa às PS encontradas na saliva humana, levantando algumas questões inerentes à especificidade da interação.^{24, 92} De facto, o uso de proteínas não-salivares que apresentem uma estrutura diferente das encontradas na saliva humana é alvo de alguma reticência, uma vez que, como já referido, vários estudos demonstram a influência que este fator tem na interação polifenol-proteína. Ainda, muitos dos investigadores que focam o seu trabalho na compreensão do desenvolvimento da adstringência parecem atentar mais na influência individual das diferentes PS, muitas vezes desvalorizando em parte o papel da saliva total. Conseqüentemente, sabe-se atualmente que as PRPs parecem ser as que mais interferem neste processo, sendo importante a sua concentração relativa na saliva perante compostos adstringentes.⁶⁴ Por outro lado, demonstrou-se também que os taninos hidrolisáveis parecem interagir melhor com as proteínas e são percecionados como mais adstringentes do que os condensados.^{24, 64, 79} Porém, isto poderá não estar necessariamente associado de igual modo à maior capacidade de precipitação.²⁴ Logo, e apesar de já se ter confirmado que a precipitação das PS é um processo importante no desenvolvimento da adstringência, esta não deverá ser a única causa para o mecanismo ocorrer, visto ter-se provado também que existem agentes adstringentes incapazes de precipitar diferentes proteínas.^{42, 111} Em suma, a origem da adstringência não pode ser resumida à simples interação tanino-PS, apesar de esta continuar a ser aceite como a base de todo o mecanismo, pois este fenómeno envolve uma grande complexidade de variantes.

5. Amargor

A percepção do amargor é geralmente associada a uma importante função de defesa que os animais possuem de modo a evitar a ingestão de muitos compostos venenosos. No entanto, nem todas as substâncias percecionadas como amargas são

tóxicas e, portanto, este fenómeno não deverá ser apenas associado a um mecanismo de defesa. O sabor amargo é descrito como uma sensação gustativa, mais facilmente detetada nas papilas gustativas da parte de trás da língua, que também aumenta com a ingestão repetida de compostos amargos.¹¹² De entre os 5 sabores básicos, o amargor é o mais complexo e menos descrito.¹²² Porém, as células recetoras sensoriais e o mecanismo molecular associados encontram-se já bem definidos.^{123, 124} Existem também bases de dados (e.g. BitterDB) com diversos compostos descritos como amargos. Pensa-se que o amargor é modelado por células recetoras de sabor (TRC) especializadas, em corpúsculos gustativos da boca. Estas células expressam seletivamente uma família de recetores acoplados à proteína G (GPCRs), os TAS2Rs, e estes parecem ser os responsáveis pelo reconhecimento do amargor por moléculas extracelulares.¹²⁵ Também já é aceite que, após a ativação dos TAS2Rs, o mecanismo molecular é caracterizado por uma cascata de transdução de sinal mediada por proteínas G e que no final resulta numa resposta celular.^{126, 127} Existem 25 TAS2Rs humanos, constituídos por 290-330 aminoácidos, e com alta similaridade nesta sequência.^{122, 128} No entanto, eles apresentam uma certa diversidade a nível estrutural que lhes permite reconhecer compostos também com algumas diferenças de estruturas. Na verdade, verifica-se que diferentes compostos podem ativar o mesmo TAS2R e a situação reversa também pode ocorrer, ou seja, diferentes recetores podem ser ativados pela mesma substância.¹³ Esta diversidade de TAS2Rs permite que diferentes estímulos amargos ativem diferentes subpopulações de TRC, o que explica que diferentes indivíduos não percecionem o amargor de igual modo.¹²⁸⁻¹³⁰ O desafio tem sido também tentar perceber como é que compostos com estruturas tão diversas conseguem desencadear uma sensação de amargor tão uniforme e consistente.³ A **Figura 13** demonstra a estrutura destes recetores, salientando os seus domínios transmembranares (estrutura em hepta-hélice) e resíduos mais comuns.¹³¹

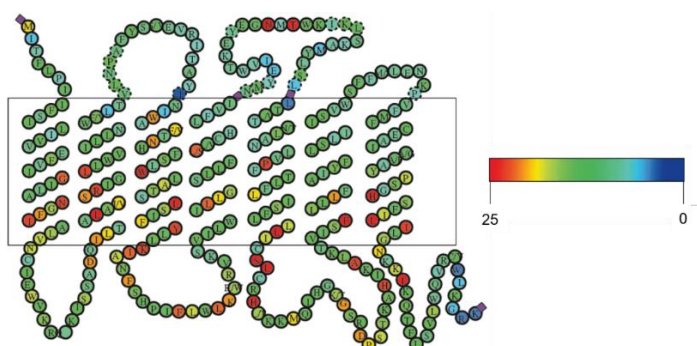


Figura 13. Representação esquemática da estrutura dos hTAS2Rs e dos seus domínios transmembranares, característicos das proteínas G. Os aminoácidos constituintes destas proteínas estão representados nos círculos por letras, sendo que os delimitados a tracejado correspondem aos resíduos que não são encontrados em todos os recetores. O código de cores utilizado indica a similaridade da sequência entre os 25 hTAS2Rs.

Adaptado de Meyerhof, W. (2005)

Apesar de alguns aminoácidos localizados nas regiões intracelulares estarem presentes em quase todos os TAS2Rs, os domínios extracelulares (*loops*) são menos conservados. Esta será, provavelmente, a característica estrutural que permite formar os motivos heterogêneos de ligação aos diferentes compostos amargos.¹³¹

O amargor é usualmente desencadeado pela exposição a compostos derivados das plantas, em particular flavonóides, mas também iões, aminoácidos, alcaloides, açúcares, entre outros.^{3, 132} De um modo geral, e à semelhança do que acontece com a adstringência, o amargor parece aumentar com a concentração de polifenóis.¹³² Apesar de ser um pouco controverso,^{113, 133} o grau de polimerização e a perceção do amargor parecem apresentar uma relação inversa, sendo que a intensidade aumenta quando estão envolvidos compostos polifenólicos de menores dimensões.¹³⁴ Aliás, monómeros de flavonóides são percecionados mais como amargos do que como adstringentes.^{113, 132} Um exemplo específico desta relação é o dos estereoisómeros (-)-epicatequina e (+)-catequina, os quais desencadeiam uma maior perceção do amargor do que os dímeros e ainda mais do que os trímeros constituídos por ambos os monómeros.¹³⁵ Porém, a (-)-epicatequina está descrita como sendo mais amarga do que o seu isómero (+)-catequina, sugerindo que a dimensão dos compostos não é a única característica que define o seu grau de amargor. O aumento da polimerização poderá estar associado com o aumento das interferências estéricas que reduzem a força das interações entre os flavonóides e o recetor a que se ligam, diminuindo a intensidade da perceção de amargor.¹³⁵ Não obstante, um outro estudo mostrou que o limite de deteção do amargor das procianidinas diméricas é consideravelmente menor do que dos respetivos monómeros, sugerindo que mesmo em concentrações mais baixas, os polímeros serão mais responsáveis pelo sabor amargo do vinho tinto.¹³³

Relativamente a outros fatores que possam afetar o amargor, este não parece variar consideravelmente com o pH ou a viscosidade. Por outro lado, o etanol e a adição de açúcares parecem desencadear efeitos contrários neste mecanismo. Altas concentrações de etanol aumentam a perceção do amargor, enquanto a adição de açúcares reduz o efeito.¹¹⁰ Relativamente ao fluxo de saliva, verifica-se que indivíduos com fluxos mais baixos demoram mais tempo a desenvolver este sabor, mas a intensidade percecionada é maior.¹³⁵

Apesar de já terem sido reportados inúmeros compostos amargos, ainda há um défice de informação neste aspeto relativamente aos polifenóis encontrados nos alimentos. Não existe também uma relação clara entre o amargor e a estrutura dos polifenóis e os resultados até agora obtidos são de algum modo inconsistentes.¹¹⁷ Assim,

começa a surgir algum interesse por parte dos investigadores neste sentido de uma maior definição destas relações.

Um estudo demonstrou a ativação de três TAS2Rs (TAS2R4, TAS2R5 e TAS2R39) pela (-)-epicatequina com diferentes intensidades e de uma forma dependente da concentração aplicada. O mesmo estudo¹³ demonstrou também a ativação destes recetores de sabor amargo por outro tipo de flavonóides (e.g. malvidina-3-O-glucósido, TAS2R7) e foram determinados os respetivos valores da concentração efetiva na inibição de metade da atividade (EC_{50}). Ainda, apesar de alguns estudos sensoriais não reconhecerem certos polifenóis como amargos,³⁰ não significa necessariamente que estes não poderão ativar nenhum TAS2R.¹³ No que diz respeito às antocianinas, apesar de estudos mais antigos contrariarem a ideia da sua associação na modelação do sabor dos alimentos,³⁰ existem já algumas evidências do seu papel na adstringência e no amargor.^{13,}
¹⁴ Assim, é necessário um maior foque nesta área de investigação e uma maior especificação das técnicas envolvidas.

II. Objetivos

II. Objetivos

A ingestão de alimentos ricos em polifenóis apresenta inúmeros benefícios para a saúde. A introdução ou reforço destes fitonutrientes na dieta representa uma importante medida na prevenção do desenvolvimento de muitas doenças. Aliás, a consciencialização da importância de uma dieta rica em alimentos derivados das plantas no bem-estar geral tem vindo a aumentar. No entanto, como alguns polifenóis são adstringentes e amargos, estes estão geralmente associados ao desenvolvimento de sensações organoléticas desagradáveis e, por isso, são muitas vezes rejeitados pelo consumidor comum. Por outro lado, quando estes atributos são devidamente modelados para níveis equilibrados, podem ser desejáveis em alguns produtos, como no vinho, chá e cerveja.

Considerando que os processos de interação entre polifenóis-proteínas poderão estar na origem do desenvolvimento da adstringência e do amargor, a compreensão dos mecanismos associados a estas interações torna-se de extrema importância no intuito de modelar estas sensações. No entanto, o objetivo será que esta modelação não implique necessariamente a redução da quantidade dos polifenóis na dieta. Assim, o intuito primordial desta tese de mestrado é compreender qual o papel de diferentes famílias de proteínas salivares (PS) no desenvolvimento da adstringência e do sabor amargo.

O estudo relativo à adstringência tem como objetivo comparar a capacidade de interação de diferentes PS isoladas da saliva humana com duas classes de polifenóis, as antocianinas e os taninos. Pretende-se estabelecer uma relação entre esta capacidade de interação e as estruturas moleculares de ambas as espécies envolvidas. Por um lado, tenciona-se também estudar a interação entre três PS (estaterina, péptido P-B e cistatinas) e duas classes de taninos (hidrolisáveis e condensados) que apresentam características estruturais distintas. Por outro lado, deseja-se perceber qual o efeito da adição de antocianinas na formação das interações polifenol-PS, através do fenómeno de copigmentação.

Relativamente ao sabor amargo, as experiências realizadas basearam-se em dois estudos independentes. No primeiro, o intuito principal será estudar a ativação de diferentes recetores do sabor amargo (TAS2Rs) por vários polifenóis percecionados como amargos. No segundo, pretende-se compreender se e de que forma a presença das PS poderá afetar as ativações dos TAS2Rs por polifenóis já abordados em outros estudos, influenciando assim a percepção do amargor.

A utilização de diferentes técnicas nestes estudos (fluorescência, STD-NMR e ITC) tem como objetivo reunir novas informações nesta área de investigação com vista a sua possível aplicação futura.

III. Material e Métodos

III. Material e Métodos

1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados nas experiências são de qualidade analítica ou superior. O acetonitrilo (ACN), o metanol (99,8%), o ácido fórmico (99-100%), o HCl e o ácido acético (99-100%) foram adquiridos à *Chem-Lab*, o ácido trifluoroacético (TFA) e o acetato de etilo (99,8%) à *Sigma-Aldrich* e o etanol 99% à marca AGA, Álcool e Géneros Alimentares, SA. O gel RP-18 (40-63 μ m) LiChroprep utilizado pertence à marca *Merck* (Damstadt, Alemanha). A (-)-epicatequina foi comprada à *Sigma-Aldrich* e apresenta uma pureza maior do que 90%. Os polifenóis epigallocatequina-3-galato (EGCG) e pentagalhoilglucose (PGG) foram comprados à *Biopurify Phytochemicals Ltd.* (Chengu, Sichuan, China) com uma pureza maior do que 98%.

2. Isolamento, purificação e identificação das PS

Para a obtenção das diferentes famílias de PS, foram recolhidas amostras de saliva total de voluntários masculinos e femininos saudáveis e não fumadores, com idades compreendidas entre os 22 e 36 anos. A recolha foi efetuada sempre às 14h para reduzir a variabilidade da concentração das PS inerente às flutuações dos ritmos circadianos de secreção. A ingestão de qualquer tipo de alimento ou bebida durante pelo menos uma hora antes da dádiva foi desaconselhada. Os dadores acumularam saliva no interior da cavidade oral durante aproximadamente 10 minutos e esta foi então recolhida num falcon.

Após a recolha, foi adicionado 25 μ L de uma solução de TFA a 10% a cada 1800 μ L de saliva total, obtendo-se no final uma concentração de 0,1% de TFA. Esta mistura foi agitada no *vortex* e seguidamente centrifugada a 11,500 rpm durante 7 minutos. Do resultado da centrifugação, a porção precipitada, que inclui proteínas de alto peso molecular como α -amilase e mucinas, foi descartada. O sobrenadante, correspondente à saliva acídica, foi aplicado numa membrana de diálise (*cut-off* da membrana de 3,5 KDa), de modo a reter as proteínas de maiores dimensões e rejeitar as mais pequenas. O processo de diálise ocorreu em água desionizada ao longo de 24h a 4 °C com agitação baixa constante e com mudanças de água periódicas (pelo menos 3 vezes). A saliva resultante foi novamente submetida a centrifugação, a 3000 rpm durante 5 minutos. Seguidamente, o sobrenadante foi liofilizado e ressuspendido numa proporção de 1:10 para ser depois purificado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) semi-preparativo. Esta técnica permitiu o isolamento de 6 famílias de PS (bPRPs, aPRPs,

gPRPs, estaterina, péptido P-B e cistatinas), de acordo com o seu tempo de retenção, as quais foram seguidamente liofilizadas para posterior utilização.

Para o isolamento das PS, foi utilizado um sistema HPLC Lachrom Merck, *Hitachi* (L-7100) equipado com uma coluna de fase reversa Vydac C8 (*Grace Davison Discovery Sciences*, partícula de 5 μm , 150 x 2,1 mm). A deteção foi feita a 214 nm e foram utilizados dois eluentes: eluente A (TFA a 0,2% em água destilada) e eluente B (TFA a 0,2% numa mistura de 80/20 (v/v) de ACN/água). O gradiente foi mantido linear de 10% a 40% de eluente B durante 60 minutos, a um fluxo de 0,60 mL.min⁻¹, após o qual a percentagem de eluente B aumentou para os 100% durante 10 minutos. Este incremento teve como objetivo limpar a coluna de HPLC, de modo a eluir outras proteínas que tenham ficado retidas. Por fim, a coluna foi estabilizada nas condições iniciais (90% de eluente A e 10% de eluente B).

A identificação das PS foi alcançada por recurso a espetrometria de massa com ionização por *electrospray* (ESI-MS) por análises de injeção de fluxo num espectrómetro de massa LTQ Orbitrap XL (*Thermo Fischer Scientific*, Bremen, Alemanha) controlado pelos programas LTQ Tune Plus 2.5.5 e Xcalibur 2.1.0. A voltagem do *electrospray* foi de 3100 V e a temperatura do capilar utilizada foi 275 °C. O fluxo de gás de azoto utilizado foi de 5 (unidades arbitrárias do *software*). As amostras foram diluídas numa mistura metanol/ACN/TFA 0,01% (5:5:90 v/v) 1:10 antes da análise correspondente. Após a análise de espectroscopia de massa, a deconvolução dos correspondentes espectros de massa foi efetuada no *software* MagTan 1.03.

3. Extração, isolamento e purificação de polifenóis

3.1. Elagitaninos

Os elagitaninos utilizados nas experiências foram obtidos por extração direta de produtos naturais, recorrendo a processos químicos simples e frequentemente utilizados em enologia.

A vescalagina, castalagina e grandinina foram obtidos a partir de *chips* de madeira de carvalho. Mais precisamente, foram pesadas cerca de 8 g de *chips* e adicionado 200 mL de uma mistura 50/50 (v/v) de metanol/água. A amostra foi submetida ao aparelho de ultrassons durante 30 minutos, após os quais ficou em agitação constante durante 2 h. O extrato resultante foi filtrado num funil e com papel de filtro, de modo a separar as porções de maiores dimensões. A mistura foi submetida ao evaporador rotativo para retirar o metanol presente e concentrar a solução. Seguidamente, a amostra foi aplicada em C18 e foram recolhidas duas frações, uma eluída apenas com água e outra com uma solução

de metanol a 10%. Ambas as frações foram juntas e novamente sujeitas ao evaporador rotativo para eliminar o metanol restante. A solução resultante foi aplicada em HPLC preparativo, de modo a isolar e purificar os três elagitaninos de interesse (vescalagina, castalagina e grandinina). A identificação dos taninos foi também confirmada por LC-MS.

A punicalagina foi obtida como descrito na literatura,¹⁹ a partir da romã, mais concretamente, utilizando 1g de casca em pó do fruto. A extração deste pó foi realizada 2 vezes com 30 mL de etanol a 40% e com auxílio de ultrassons durante 30 minutos. Depois de evaporar completamente o etanol presente, o extrato foi liofilizado e analisado por cromatografia líquida seguida de análise por espetrometria de massa (LC-MS) de modo a comprovar a presença da punicalagina. Adicionalmente, o isolamento e purificação foram conseguidos por HPLC preparativo e a determinação da sua pureza foi também realizada por LC-MS e ¹H RMN (ressonância magnética nuclear).

No isolamento e purificação dos elagitaninos, recorreu-se a um sistema UHPLC Dionex UltiMate 3000, *Thermo Fischer Scientific* equipado com uma coluna de fase reversa PrepLC C18 (*Waters*, 150 x 2,5 mm). A deteção foi feita a 250 nm e foram utilizados dois eluentes: eluente A (ácido acético a 1% em água destilada) e eluente B (ácido acético a 1% numa mistura de 80/20 (v/v) de ACN/água). O gradiente foi mantido linear de 0% a 43% de eluente B durante 35 minutos e depois manteve-se em 90% de eluente B até aos 45 minutos, a um fluxo de 4 mL.min⁻¹. Após as diferentes frações de interesse terem sido eluídas, o gradiente manteve-se linear de 90% a 0% de eluente B durante 5 minutos, para lavar a coluna.

3.2. Procianidinas

As procianidinas B1, B2, B7, Trímero C1 e B2 galhato (B2g) foram obtidas a partir de um extrato de grainhas de uva *Vitis vinifera* L. Este extrato foi fracionado de modo a obter frações de procianidinas com diferentes pesos moleculares, de acordo com o que se encontra reportado na bibliografia.¹³⁶ O fracionamento foi realizado numa coluna de gel TSK Toyopearl HW-40(s) (100x16 mm d.i.) com recurso a metanol e metanol/ácido acético como eluentes, a um fluxo de 0,8 mL.min⁻¹.¹³⁷ A eluição foi efetuada de modo a obter 5 frações, às quais foi adicionada água desionizada e o metanol foi eliminado no evaporador rotativo. As frações obtidas foram congeladas e liofilizadas, tendo sido utilizadas as frações I e II para isolar as procianidinas de interesse.

Para isolar e purificar as frações correspondentes às procianidinas de interesse, foi utilizado um sistema UHPLC Dionex UltiMate 3000, *Thermo Fischer Scientific* equipado com uma coluna de fase reversa PrepLC C18 (*Waters*, 150 x 2,5 mm). A deteção foi realizada a 280 nm e foram utilizados dois eluentes: eluente A (ácido fórmico a 1% em

água destilada) eluente B (ácido fórmico a 1% em ACN). O gradiente foi mantido linear de 10% a 14,5% de eluente B durante 37 minutos, de 14,5% a 20% de eluente B até aos 40 minutos, de 20% a 35% de eluente B até aos 55 minutos e de 35% a 90% de eluente B até aos 57 minutos, a fluxo 0,5 mL.min⁻¹. Depois, o gradiente manteve-se em 90% de eluente B até aos 62 minutos, a partir dos quais foi reduzido até 0% durante 3 minutos, para lavar a coluna.

3.3. Malvidina-3-O-glucósido

Para obtenção da antocianina malvidina-3-O-glucósido, partiu-se de um extrato de vinho, o qual foi obtido por concentração de 50 L de vinho tinto num sistema de nanofiltração. Resumidamente, após evaporação do etanol presente no vinho, os açúcares foram removidos em gel C18 e o extrato resultante foi liofilizado.

Pesou-se 5 g do extrato de vinho liofilizado e dissolveu-se em 200 mL de água acidulada (aproximadamente 0,01% HCl). De seguida, foi realizada uma extração líquido-líquido com acetato de etilo, numa proporção 1:1, de modo a remover os compostos orgânicos que não correspondessem a antocianinas. A fase aquosa resultante desta extração foi submetida ao evaporador rotativo para descartar algum do acetato de etilo restante e posteriormente foi purificada em gel C18. A fração que continha as antocianinas monoglucósidas de interesse foi eluída com 30% de metanol acidulado (aproximadamente 0,01% HCl). A remoção do metanol foi efetuada no evaporador rotativo e de seguida a amostra foi aplicada em coluna de cromatografia de fase reversa de gel C18, de modo a separar a malvidina-3-O-glucósido das restantes antocianinas monoglucósidas. Para tal, a antocianina foi eluída com 20% de metanol também acidulado, o qual foi novamente evaporado para posterior congelação e liofilização da amostra final. A pureza da maldivina-3-O-glucósido foi assegurada por análises de LC-MS.

4. Síntese de procianidinas

As procianidinas diméricas B3, B4, B6 e B8, bem como o trímero C2 utilizados nas experiências aqui reportadas foram obtidos por hemisíntese química, como descrito na literatura¹³⁸ e já otimizado.

Resumidamente, uma mistura de 200 mg de taxifolina e 575 mg de (+)-catequina (no caso dos dímeros B3 e B6) ou (-)-epicatequina (no caso dos dímeros B4 e B8), numa proporção de 1:3, foi dissolvida em etanol sob uma atmosfera de árgon e adicionou-se gota-a-gota uma solução de tetraidreto de boro (em etanol). No caso específico do trímero C2, o rácio de taxifolina e (+)-catequina foi ajustado para 1:1 de modo a favorecer

a obtenção de produtos mais polimerizados. O pH da solução foi ajustado a 4,5 com uma mistura de 50/50 (v/v) ácido acético/água e esta foi mantida sob a atmosfera de árgon durante 30 minutos. A solução foi de seguida extraída com acetato de etilo e após evaporação do mesmo, foi adicionada água. O produto resultante foi aplicado em gel C18, adicionou-se água e o produto final foi recuperado com metanol. Este último foi removido no evaporador rotativo, para que depois a amostra pudesse ser separada numa coluna de gel TSK Toyopearl HW-40(s) (300 mm x 10 mm i.d., 0,8 mL.min⁻¹). A amostra foi eluída com metanol e a separação foi monitorizada por um detetor UV-Vis. As várias frações obtidas foram analisadas por ESI-MS (*Finnigan DECA XP PLUS*) e as que continham as procianidinas de interesse foram analisadas por HPLC-MS.

5. Ensaios de extinção de fluorescência

A extinção de fluorescência foi medida para a interação de três PS que apresentam fluorescência intrínseca (estaterina, péptido P-B e cistatinas), devido ao seu conteúdo em resíduos aromáticos (triptofano e tirosina), com dois tipos de taninos, elágicos (vescalagina, castalagina e punicalagina) e condensados (procianidinas B3 e B6). Para tal, o triptofano foi o aminoácido utilizado como fluoróforo intrínseco.

As misturas foram todas preparadas em água destilada e foi utilizada uma concentração de 30 µM de PS, sendo que os taninos foram titulados em concentrações crescentes (de 0 a 50 µM). Porém, no caso da interação entre a estaterina e os três elagitaninos, como o sinal da sua fluorescência intrínseca era muito reduzido, foi utilizada uma concentração de 60 µM desta PS. O comprimento de onda de excitação (λ_{ex}) foi 284 nm, e o espectro de emissão foi registado entre 290-500 nm.

Ao contrário dos taninos hidrolisáveis abordados, os dímeros de procianidinas B3 e B6 exibem fluorescência intrínseca ao λ_{ex} estipulado e, por isso, para estes taninos foram realizadas medições de branco para cada uma das concentrações utilizadas. Nos brancos, o volume de proteína utilizado nas medições com interação foi substituído por água destilada. Os sinais de fluorescência registados foram, posteriormente, subtraídos aos correspondentes valores das medições dos complexos dímero-PS.

Para avaliar a possibilidade de ocorrência de transferência de energia de ressonância por fluorescência (FRET) entre as PS e os taninos condensados, os espectros de absorção e emissão de ambos foram analisados. Verifica-se que as PS estudadas apresentam um espectro de absorção de 200 a 290 nm, sendo que a estes comprimentos de onda as procianidinas não emitem luz (máximo a 330 nm). Os taninos condensados têm um máximo de absorção a 270 nm, e os seus espectros diminuem até atingirem valores residuais perto dos 310 nm. O espectro de emissão das PS começa a 320 nm, e a este

comprimento de onda a absorvância dos polifenóis é baixa. Assim, é pouco provável que se verifiquem fenómenos de FRET nas condições experimentais utilizadas. Para corrigir o efeito de filtro interno,¹³⁹ a densidade ótica de cada mistura foi medida de modo a determinar a concentração de tanino máxima a utilizar. Assim, foi tido em consideração um fator de absorvância máxima de 0,3 para a escolha das referidas concentrações.

Todos os *stocks* de polifenóis e PS foram preparados em água destilada e após a mistura das duas espécies nas concentrações desejadas, as soluções foram agitadas no *vortex* durante cerca de 10 segundos. Seguidamente, 70 µL das amostras foram transferidas para uma célula de fluorímetro (*Hellma Analytics*, 3 x 3 mm), previamente lavada com etanol e água destilada, e os espectros de emissão foram então medidos num *Perkin-Elmer* LS 45 Luminescence Spectrometer. O sinal de fluorescência foi registado no comprimento de onda em que a intensidade de fluorescência de cada PS era máxima. Deste modo, estudos prévios dos ensaios de branco de cada PS revelaram que estes comprimentos de onda de máxima intensidade correspondiam a 314 nm, 313 nm e 355 nm para a estateterina, o péptido P-B e as cistatinas, respetivamente. No que diz respeito aos ensaios com os taninos condensados, os seus sinais intrínsecos de fluorescência foram também registados tendo em consideração o comprimento de onda de máxima intensidade.

Os resultados dos estudos de extinção de fluorescência foram abordados tendo em conta a equação de Stern-Volmer (**equação 1**)¹³⁹:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (\text{equação 1})$$

Nesta equação, F_0 e F representam as intensidades de fluorescência antes e após a adição do *quencher* (tanino), respetivamente; k_q corresponde à constante bimolecular; τ_0 é o tempo de vida do fluoróforo (PS) na ausência do *quencher*; $[Q]$ diz respeito à concentração do *quencher*; K_{SV} é a constante de Stern-Volmer. Assim, e recorrendo a esta equação, os resultados de fluorescência obtidos foram representados em gráficos da razão F_0/F em função de $[Q]$ (gráficos de Stern-Volmer), de modo a que fosse possível posteriormente determinar o valor de K_{SV} por regressão linear.

No caso de não se verificar linearidade no gráfico de Stern-Volmer, surge um novo termo para descrever a constante de afinidade, denominada de “constante aparente de Stern-Volmer” (K_{app}) e a **equação 1** anterior é modificada para a seguinte (**equação 2**):

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_{app} [Q]) \exp([Q]VN/1000) \quad (\text{equação 2})$$

Esta constante é semelhante à K_{SV} e também pode ser calculada por regressão linear, a partir de um gráfico de $\ln(F_0/F)$ em função de $[Q]$.

Para que este fenómeno de extinção de fluorescência ocorra, independentemente do mecanismo em causa (estático ou dinâmico), o fluoróforo e o *quencher* têm de estar em contacto. Tendo este facto em consideração, e com base no valor de k_q , é possível prever qual o tipo de mecanismo presente. Para determinar estes valores de k_q , é necessário obter primeiro os valores de K_{SV} e τ_0 e calcular a razão entre os dois.

5.1. Determinação do tempo de vida (τ_0)

O termo de “tempo de vida de fluorescência” (τ_0) de um fluoróforo corresponde ao tempo de excitação que esta espécie, neste caso as PS, se mantém no estado excitado. Estes valores foram medidos por um espectrofotómetro Fluoromax-4 acoplado a um controlador contador de fótons (*FluoroHub*), ambos da marca *Horiba Jobin-Yvon*, à temperatura ambiente. A excitação de fluorescência foi realizada com recurso a uma fonte *Horiba* Nano LED de 290 nm e a emissão de fluorescência foi registada ao comprimento de onda máximo de cada PS (314, 313 e 355 nm). O perfil da lâmpada foi registado por substituição da amostra por uma solução diluída de LUDOX em água destilada.^{140, 141}

6. Saturation Transfer Difference-Nuclear Magnetic Resonance (STD-NMR)

Saturation Transfer Difference-Nuclear Magnetic Resonance (STD-NMR) é uma técnica espectroscópica comumente utilizada para estudos de interação molecular entre duas espécies em solução, mais especificamente entre uma proteína (recetor) e um ligando. Este método apresenta resultados com bastante sucesso devido à sua grande aplicabilidade, robustez e sensibilidade. Permite obter informações essenciais para estudos de interação, como constantes de associação e mapeamento de epítomos de interação, sem com isto exigir grandes quantidades das espécies intervenientes. Uma das principais vantagens do STD-NMR é a de não requerer a caracterização do espectro de RMN da proteína, baseando-se apenas nos sinais do ligando em solução.¹⁴²

Nesta metodologia são obtidos dois espectros diferentes para cada análise, os quais são posteriormente subtraídos. O primeiro é denominado de “*off-resonance*”, em que a proteína não é saturada e todos os sinais de protão de todas as moléculas em solução são obtidos. No segundo espectro, correspondente ao “*on-resonance*”, a proteína é seletivamente saturada por irradiação de uma zona específica do seu espectro. Após obtidos os dois espectros, o de *on-resonance* é subtraído ao de *off-resonance* e surge um terceiro espectro (espectro de diferença), onde alguns dos sinais do espectro de *off-resonance* são anulados. Neste espectro, apenas os componentes da solução que se

ligaram à proteína e, consequentemente, receberam transferência de saturação, estão presentes. Destes sinais dos prótons que estavam realmente em contacto com a proteína, os que apresentam maior afinidade para o recetor apresentam sinais mais intensos, devido a uma maior eficiência da transferência de saturação. A imagem da **Figura 14** mostra os três espetros mencionados e representa o esquema na origem do espetro de diferença.

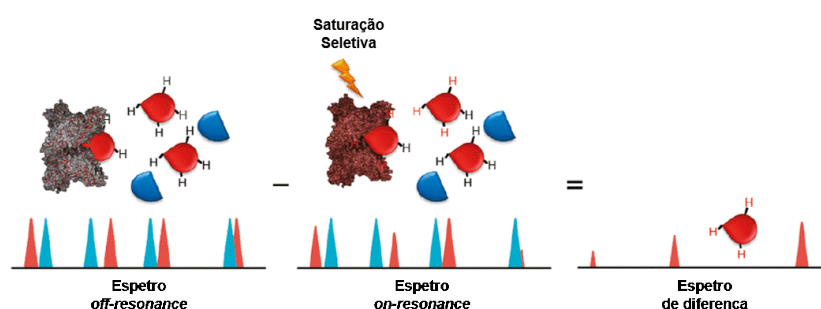


Figura 14. Representação dos espetros obtidos por STD-NMR. O espetro de diferença resulta da subtração dos espetros obtidos diretamente das medições espectroscópicas, mais precisamente do espetro de *on-resonance* ao de *off-resonance*. A vermelho encontram-se representadas as espécies de ligando e os respetivos sinais no espetro, enquanto que as representações a azul correspondem às espécies não ligantes. Adaptado de Viegas, A. *et al.* (2011)

A partir desta técnica e aplicando as **equações 3 e 4** é possível calcular o fator de amplificação de STD (A_{STD})¹⁴² e a constante de associação (K_A), respetivamente. Estes valores, por sua vez, permitem comparar e retirar inferências acerca da força relativa de diferentes interações.

$$A_{STD} = \frac{I_0 - I_{SAT}}{I_0} \times \frac{[L]}{[P]} = \frac{I_{STD}}{I_0} \times \frac{[L]}{[P]} = \frac{\alpha_{STD}[L]}{K_D + [L]} \quad \text{(equação 3)}$$

$$K_A = \frac{1}{K_D} \quad \text{(equação 4)}$$

Nestas equações, I_{SAT} é a intensidade do sinal do espetro da PS seletivamente saturada (*on-resonance*), enquanto I_0 representa a intensidade do sinal do espetro medido sem saturação da proteína (*off-resonance*). $[L]$ e $[P]$ são as concentrações de ligando e PS, respetivamente. α_{STD} é o fator de amplificação máximo e K_D corresponde à constante de dissociação.

Os estudos de STD-NMR realizados tanto com taninos elágicos, como condensados foram realizados utilizando concentrações fixas de cada PS de 3 μ M, sendo que os ligandos foram adicionados sob a forma de pó liofilizado em concentrações crescentes (0,1 a 3,5 mM).

Para os estudos de copigmentação, as misturas entre a (-)-epicatequina e malvidina-3-O-glucósido (0,34 a 6,8 mM; rácio 1:1) foram previamente preparadas, liofilizadas e adicionadas a uma solução de bPRPs ou aPRPs a 9 μ M.

Cada uma das soluções foi preparada em água deuterada (D_2O) e o pH das interações de copigmentação foi acertado a 1,0 com HCl deuterado (DCI) para cada análise. As experiências de STD-RMN foram realizadas num espectrómetro *Bruker Avance III 600 HD* a 600,13 MHz, equipado com uma *CryoProbe Prodigy* de 5 mm e unidades de pulso de gradiente capazes de produzir gradientes de campo magnético na direção z de 50 G cm^{-1} . As medições foram realizadas com sequências de pulso *standard Bruker* a 300 K. Os espectros de 1H e STD foram registados conforme descrito na literatura¹⁴³. No final, o processamento dos espectros de STD-NMR, foi efetuado no *software* TopSpin 2.1 da *Bruker*. Depois da determinação de A_{STD} a partir dos resultados experimentais (**equação 3**), foi traçado um gráfico destes valores em função de $[L]$ e os valores de K_D foram determinados pelo suplemento *Solver* do *software* Microsoft Excel Office.

7. Microcalorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)

Microcalorimetria de titulação isotérmica (ITC) é uma técnica bioquímica que se baseia em medições de libertação e absorção de calor. Assemelha-se ao STD-NMR por servir de suporte a muitos estudos de interação, mas é ainda mais sensível do que este e permite abordar rácios molares mais baixos ($[tanino]/[proteína]$ 1 a 60). Com este método, é possível determinar vários parâmetros termodinâmicos (estequiometria, entalpia e entropia) importantes no estudo de interações proteína-ligando, e também as respetivas constantes de ligação (K_A).

Os estudos de ITC foram realizados a uma concentração fixa de PS de 20 μM ou 30 μM para as bPRPs e aPRPs, respetivamente. Foram injetados volumes de 4-8 μL de ligandos [(-)-epicatequina a 10 mM, malvidina-3-O-glucósido a 12 mM e mistura de ambas a 12 mM num rácio 1:1] por injeção até se atingir uma estabilização. Estas soluções foram preparadas em água destilada e o pH foi acertado a 1,0 ou 3,5-4,0, tendo sido submetidas a degaseificação antes de cada leitura. Para cada experiência, um volume de 1,4 mL das soluções de PS foi colocado na célula de leitura, enquanto o ligando foi carregado na seringa de injeção. Durante as medições, as soluções foram agitadas constantemente a 307 rpm para garantir homogeneidade e as injeções foram realizadas com espaçamento de 120 e 280 segundos.

Todas as experiências de ITC foram realizadas a 298 K num V-P MicroCalorímetro controlado pelo *software* Origin VPViewer. Os *raw data* obtidos do gráfico de fluxo de calor em função do número de injeção foram tratados e analisados utilizando o *software* AFFINIMETER, de modo a traçar gráficos da variação de entalpia em função do rácio molar. Foi feito posteriormente o *fitting* destes dados para no final se obter os valores de K_A e locais de ligação (n) diretamente pelo *software*, assim como as variações dos

parâmetros termodinâmicos para as interações estudadas. Neste último caso, o AFFINIMETER permitiu determinar diretamente os valores de variação de entalpia (ΔH), porém os termos referentes à variação da energia livre de Gibbs (ΔG) e da entropia ($-\Delta S$) foram calculados a partir das **equações 5 e 6**, respetivamente.

$$\Delta G = -RT \ln(K_A) \quad (\text{equação 5})$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (\text{equação 6})$$

R corresponde ao valor de constante de um gás ideal ($8,314 \text{ J.mol}^{-1}$) e T à temperatura utilizada, em Kelvin, sendo neste caso considerada a de $298,15 \text{ K}$ ($=25^\circ\text{C}$).

8. Transfecção e expressão de TAS2Rs

O estudo da ativação de diferentes TAS2Rs por compostos polifenólicos passou por construir um modelo *in vitro* de expressão destes recetores. Para tal, foi realizada uma expressão heteróloga de TAS2Rs em células humanas [células embrionárias de rim, (HEK)-293T] que expressam a subunidade quimérica G α 16gust44 da proteína G. Estas células cresceram em placas de 96 poços com poli-D-lisina ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (*Greiner BioOne*, Frickenhausen, Alemanha) com meio DMEM [*Dulbecco's modified Eagle medium*, 10% de soro fetal de bezerro (FCS), 1% de penicilina/estreptomicina], a 37°C , com 5% CO_2 e 95% de humidade. Após 24-26 horas, as células foram transfectadas com 150 ng de plasmídeo pB28, pEAK10 (*Edge BioSystems*) ou pcDNA5/FRT (*Invitrogen*) contendo o TAS2R a estudar e utilizando 300 ng de Lipofectamina2000 (*Invitrogen*). Para além das sequências codificantes de cada TAS2R, os plasmídeos continham também os primeiros 45 aminoácidos do recetor 3 da somatostatina de rato (para direccionar os TAS2Rs para a membrana celular) e o epítipo da glicoproteína D do vírus do herpes simples (VHS) (para possibilitar a deteção imunocitoquímica do recetor) (**Figura 15**).¹³ As sequências dos TAS2Rs estão referidas na literatura.¹⁴⁴



Figura 15. Representação esquemática da construção dos plasmídeos que contêm os diferentes recetores de sabor amargo (TAS2Rs). A região N-terminal possui uma sequência adicional referente aos 45 aminoácidos (a.a.) do recetor 3 da somatostatina de rato (r3ssr), enquanto a região C-terminal possui o epítipo da glicoproteína D do vírus do herpes simples (VHS).

8.1. Análises de medição de cálcio intracelular

A determinação da ativação dos TAS2Rs foi efetuada por deteção do aumento do cálcio (Ca^{2+}) intracelular, resultado este da pressuposta transdução de sinal do sabor amargo.¹³¹

Os estudos levados a cabo neste projeto incluíram a deteção da ativação dos 25 TAS2Rs humanos por 16 polifenóis de diferentes classes (taninos condensados, taninos hidrolisáveis, antocianina e ácidos fenólicos) (*screening*). Para além disso, todos os compostos polifenólicos abordados foram testados em diferentes concentrações de modo a perceber se existiam respostas não-específicas nas células HEK293T transfetadas com *mock* (vetores vazios pcDNA5/FRT). Assim, as concentrações máximas de cada composto utilizadas no *screening* dos TAS2Rs foram sempre mais baixas do que aquelas que originaram respostas inespecíficas na ausência de transfeção do DNA dos recetores.

Entre 24 a 26 horas depois da transfeção das células, foi adicionado uma sonda sensível ao cálcio, Fluo-4-acetoximetilester (Fluo4-AM) (2 μ M, *Invitrogen*), em soro sem DMEM. Foi também adicionado probenecide (*Sigma-Aldrich GmbH*), um inibidor do transporte aniónico, a uma concentração de 2,5 mM. Uma hora depois, as placas foram lavadas com uma solução tampão C1 [(NaCl a 130,0 mM, KCl a 5,0 mM, ácido *N*-2-hidroxietilpiperazina-*N'*-2-etanosulfónico (HEPES) a 10,0 mM, CaCl₂ a 2,0 mM e glucose a 1.0 mM (pH 7,4)] utilizando um lavador de células ELx50 (*BioTek*). As células foram incubadas com o tampão de lavagem no escuro durante mais uma hora, no final da qual foram lavadas novamente com a solução tampão C1 e lidas num leitor de placas de imagem de fluorescência (FLIPR, *Molecular Devices*). As variações de fluorescência foram medidas a 510 nm seguida de uma excitação a 488 nm antes e depois da aplicação do composto a testar em cada um dos 96 poços. Após a análise dos compostos a testar, foi feita uma aplicação de 100 nM de somatostatina-14 (*Bachem*) de modo a demonstrar a viabilidade celular, pela ativação do recetor tipo 2 endógeno de somatostatina. Todas as experiências foram realizadas em triplicado em cada placa e foram sempre feitos controlos negativos com células transfetadas com *mock*.

8.1.1. Determinação da concentração efetiva na inibição de metade da atividade (EC₅₀)

Após a identificação dos diferentes recetores ativados e uma vez estabelecida a gama de concentrações de cada polifenol, foi de seguida estudada a dose-resposta para cada par recetor/agonista. Testaram-se várias concentrações de cada composto para cada recetor cuja ativação foi observada e com estes dados foi possível estabelecer curvas dose-resposta. Para isto, as alterações de fluorescência das células transfetadas com *mock* foram subtraídas aos correspondentes valores das células que expressam os respetivos recetores. Foi feita também uma normalização do *background* da fluorescência de cada poço, de modo a compensar as diferenças de densidade celular. Os sinais de cada conjugação composto-recetor foram registados em pelo menos três poços e foi

utilizada uma média destes valores. Destes dados, foi traçado um gráfico da amplitude dos sinais em função do logaritmo da concentração do composto e os respetivos valores de EC₅₀ foram determinados. Neste sentido, foi utilizado o programa SigmaPlot (Systat Software GmbH, Erkrath, Alemanha) por regressão linear aplicando a função da **equação 5**.

$$f(x) = \min + \frac{(\max - \min)}{1 + (x/EC_{50})^{-nH}} \quad (\text{equação 5})$$

Nesta equação, x é a concentração teste do composto em estudo e nH corresponde ao coeficiente de Hill.

9. Análise Estatística

Todos os ensaios, exceto as análises de STD-NMR, foram realizados com pelo menos $n = 3$ repetições. Os valores estão expressos como médias aritméticas (SEM) e as diferenças estatísticas entre os vários grupos e valores de EC₅₀ calculados foram avaliadas por análise de variância a um fator (ANOVA), seguida pelo teste de Tuckey. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Todos os dados estatísticos foram processados pelo programa GraphPad Prism versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, EUA).

IV. Resultados e Discussão

IV. Resultados e Discussão

1. Estudos de interação taninos-PS

Realizaram-se estudos de interação entre duas classes de taninos (hidrolisáveis e condensados) e três famílias de PS, recorrendo para tal a duas técnicas espectroscópicas complementares, a extinção de fluorescência e o STD-NMR. Foram escolhidos três elagitaninos (vescalagina, castalagina e punicalagina) e duas procianidinas (dímeros B3 e B6) representativos de cada uma das classes de taninos e estes interagiram com três das PS (estaterina, péptido P-B e cistatinas) menos estudadas na literatura, mas também importantes. Os resultados permitiram comparar as diferentes afinidades e assim perceber de que modo é que as estruturas de ambas espécies poderão afetar as interações tanino-PS.

Com o intuito de estabelecer uma relação estrutura/afinidade entre os diferentes compostos, os taninos foram selecionados tendo em consideração as suas características estruturais. Por comparação com os taninos condensados, os elagitaninos são compostos mais apolares e de maiores dimensões,¹ sabendo-se já que estabelecem fortes interações com algumas PS.^{24, 64} A estrutura dos elagitaninos caracteriza-se pelas suas unidades base de HHDP e NHDP (ver **Figura 7**, da secção 1.2.2 do capítulo 1. Introdução). Em relação a esta classe de taninos, a vescalagina e a castalagina são diastereoisómeros, distinguindo-se apenas pela estereoquímica na posição C1 da unidade de glucose [**Figura 16 a) e b)**]. A punicalagina [**Figura 16 c)**], apesar de apresentar grandes semelhanças com os taninos anteriormente referidos, diferencia-se mais pela particularidade de a sua unidade de glucose ser cíclica.

As procianidinas diméricas B3 e B6 [**Figura 16 d) e e)**] distanciam-se dos elagitaninos por serem constituídos por duas unidades de catequina acopladas por uma ligação simples interflavânica. São isómeros e é a diferente posição desta ligação que permite distingui-las, sendo que a B3 apresenta uma ligação interflavânica C4→C8, enquanto a B6 se caracteriza por possuir uma ligação C4→C6.

As três PS estudadas foram selecionadas tendo por base estudos anteriores^{51, 65} que revelaram uma forte precipitação da estaterina e do péptido P-B induzida por taninos, contrariamente às cistatinas. No entanto, pouco é conhecido sobre estas interações a nível molecular, nomeadamente constantes de ligação e epítomos de ligação.

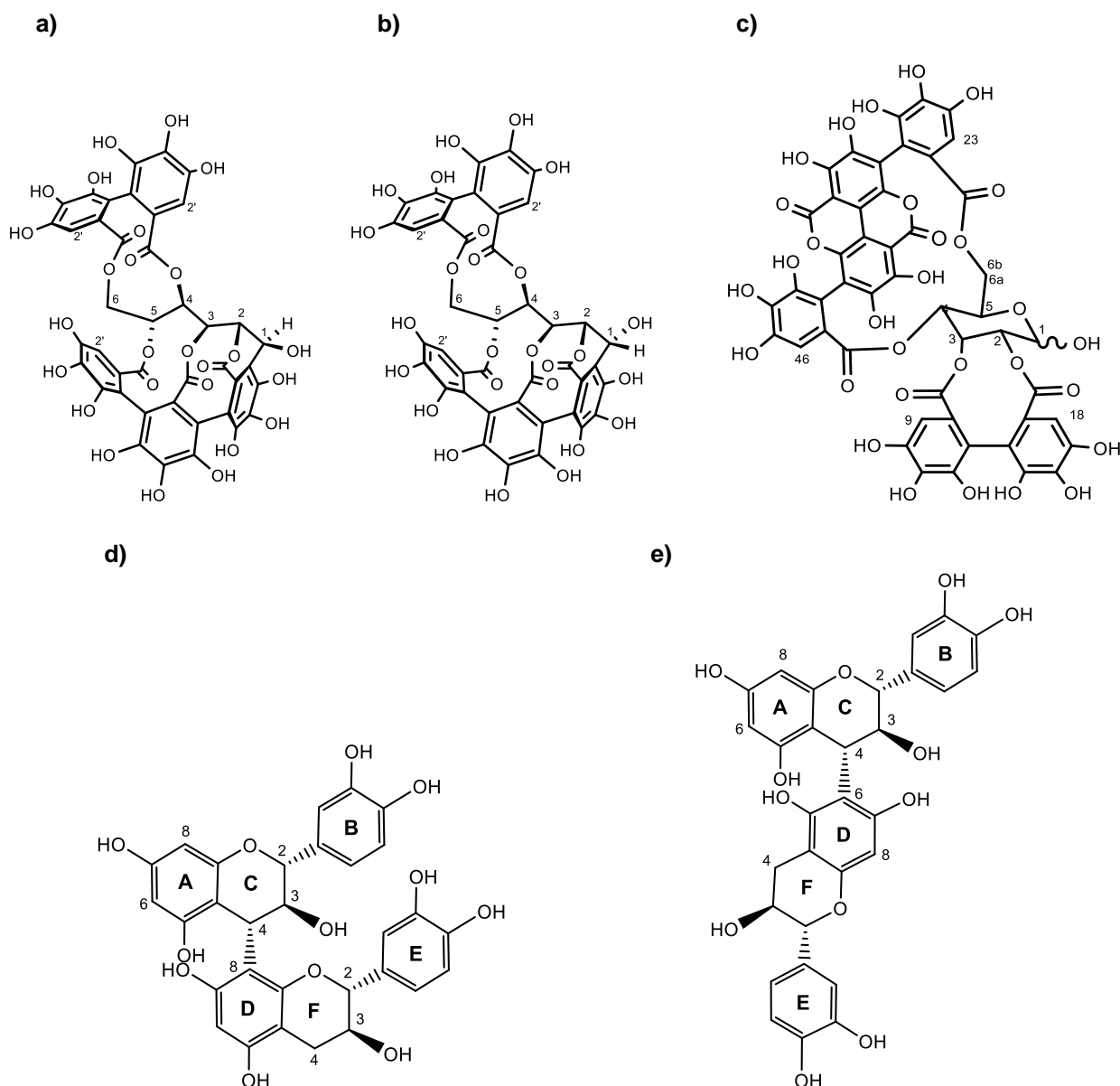


Figura 16. Estruturas químicas dos taninos estudados: elagitaninos **a)** vescalagina, **b)** castalagina, **c)** punicalagina e procianidinas **d)** B3 e **e)** B6.

1.1. Extinção de Fluorescência

A extinção de fluorescência (*Fluorescence Quenching*) é um método espectroscópico que mede a redução da intensidade de fluorescência de uma molécula que apresenta fluorescência intrínseca (fluoróforo). Neste fenómeno, o fluoróforo em solução entra em contacto com um ligando designado de “*quencher*” e esta interação leva à redução da intensidade fluorescente registada pelo fluorímetro.¹³⁹ As concentrações de ambas as espécies envolvidas influenciam o efeito observado e é esta variação que permite retirar diversas informações acerca da vizinhança do fluoróforo. Esta técnica tem sido, assim, muito utilizada no estudo das interações de polifenóis, em especial com

proteínas, por permitir compreender o maior ou menor efeito que o *quencher* (polifenol) terá na ligação ao fluoróforo (proteína).^{54, 138}

No caso dos estudos aqui realizados, as três PS possuem fluorescência intrínseca e a diminuição da sua intensidade foi observada quando os diferentes taninos anteriormente referidos foram adicionados. Como exemplo deste fenómeno, a **Figura 17** representa o espectro do péptido P-B antes e após a interação com a punicalagina, para concentrações crescentes deste tanino. Todos os gráficos de cada interação tanino-PS, com diferentes concentrações de tanino, foram obtidos em triplicado.

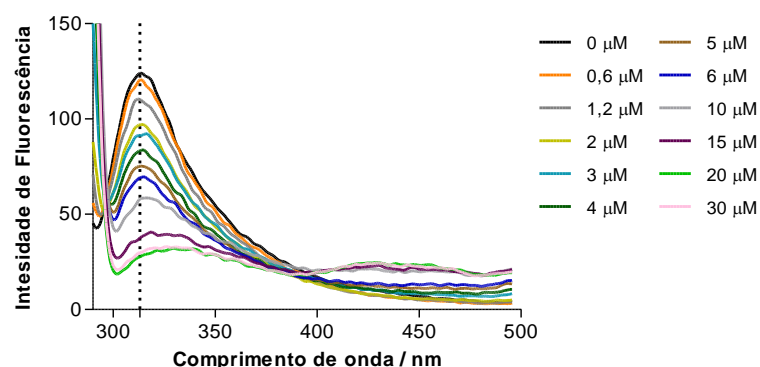
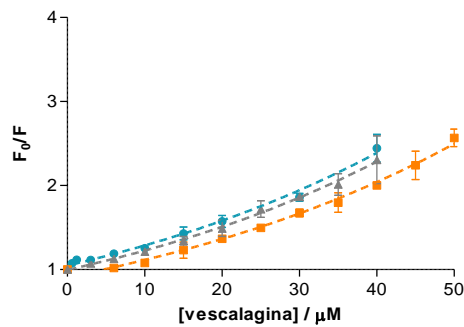


Figura 17. Espectro de fluorescência do péptido P-B (30 µM) com concentrações crescentes de punicalagina (0-30 µM), representadas pelas várias cores. A linha a tracejado mostra o comprimento de onda ao qual a intensidade de fluorescência observada é maior, no caso do péptido P-B (313 nm). Este espectro, assim como todos os outros, foi registado ao λ_{ex} de 284 nm.

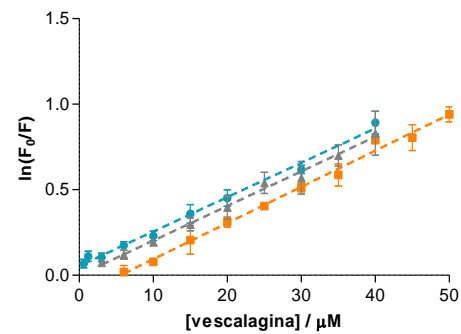
Com base na **Figura 17**, é possível observar uma redução do espectro de fluorescência do péptido P-B em resposta ao efeito provocado pela interação com a punicalagina. Mais concretamente, atentando para o sinal fluorescente máximo obtido para cada concentração de tanino (próximo de 313 nm), verifica-se um claro decréscimo à medida a que a concentração de tanino aumenta. A partir dos espectros obtidos, os valores da intensidade de fluorescência máxima para cada concentração de tanino em cada par tanino-PS foram registados e foi obtida uma média dos triplicados. No caso particular dos taninos condensados, a cada um destes valores foi subtraído a intensidade de fluorescência da correspondente concentração de procianidina na ausência de PS previamente determinada.

Com os valores de fluorescência, foram traçados gráficos de Stern-Volmer para cada interação das diferentes PS com os cinco taninos abordados [**Figuras 18 a)** e **19**].

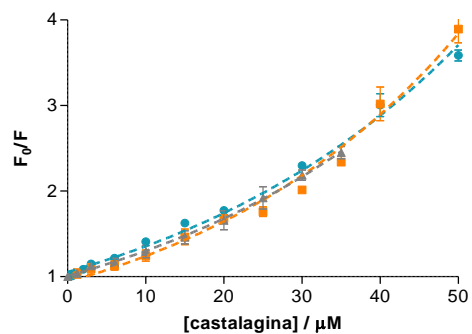
1. a)



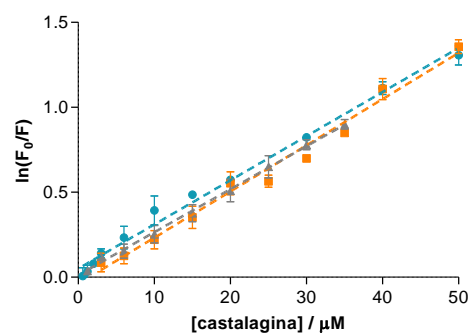
1. b)



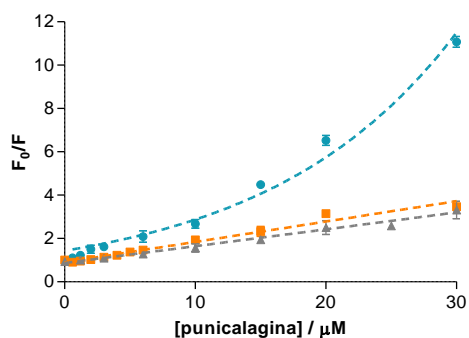
2. a)



2. b)



3. a)



3. b)

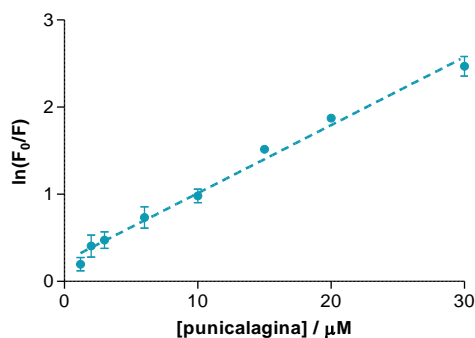
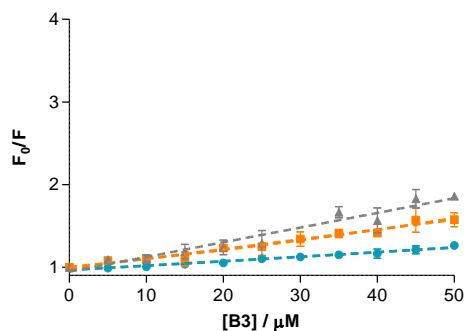


Figura 18. a) Gráficos de Stern-Volmer representativos da extinção de fluorescência das proteínas salivares (▲) estaterina, (■) péptido P-B e (●) cistatinas na presença de concentrações crescentes dos três elagitaninos 1. vescalagina, 2. castalagina e 3. punicalagina. **b)** Versão modificada dos gráficos de Stern-Volmer das curvas representadas em **a)** que não apresentam linearidade. Cada curva/reta resulta de ensaios realizados em triplicado.

a)



b)

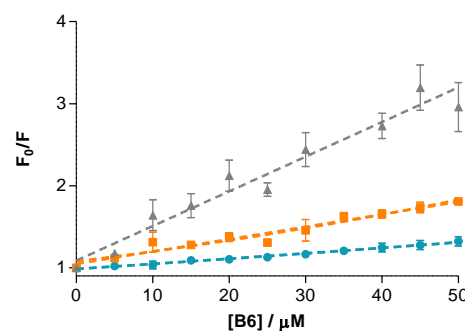


Figura 19. Gráficos de Stern-Volmer representativos da extinção de fluorescência das proteínas salivares (▲) estaterina, péptido P-B e (●) cistatinas na presença de concentrações crescentes das duas procianidinas **a)** B3 e **b)** B6.

Apenas se observou um comportamento linear para os casos das interações com os taninos condensados (**Figura 19**) e a punicalagina [**Figura 18 3.a**], exceto quando neste último caso as PS envolvidas eram as cistatinas. Porém, nas restantes situações com os três elagitaninos estudados [**Figura 18 1.a** e **2.a**], os gráficos demonstraram uma curvatura em relação ao eixo dos xx, apresentando um desvio à linearidade. Deste modo, nestes casos foi necessário recorrer à equação de Stern-Volmer modificada (**equação 2**, ver secção 5 do capítulo *III. Material e Métodos*) para obter a linearização correspondente a cada uma destas curvas, como se encontra representado na **Figura 18 b**).

Com base nos gráficos em que se observa linearidade, foi possível determinar diretamente os valores de K_{SV} correspondentes a cada interação estudada. Nas restantes situações, partiu-se dos gráficos modificados para obter os valores de K_{app} correspondente a estas interações. As duas constantes referentes a cada par tanino-PS estão sumarizados na **Tabela 1** e, como já referido, ambas expressam a afinidade de interação de cada situação.

Tabela 1. Constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) e aparentes (K_{app}) para a interação das proteínas salivares (PS) estaterina, péptido P-B e cistatinas com os três elagitaninos e os dois taninos condensados. Os valores com diferentes letras são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

Elagitaninos									
PS	Vescalagina			Castalagina			Punicalagina		
	Estaterina	Péptido P-B	Cistatinas	Estaterina	Péptido P-B	Cistatinas	Estaterina	Péptido P-B	Cistatinas
$K_{SV} (10^3 M^{-1})$	-	-	-	-	-	-	77,9±4,3 ^b	94,1±3,0 ^a	-
$K_{app} (10^3 M^{-1})$	20,2±0,9 ^{e, f}	21,1±0,6 ^e	20,1±0,6 ^{e, f}	25,3±0,7 ^d	27,2±0,8 ^d	25,9±0,6 ^d	-	-	78,2±2,4 ^b

Taninos Condensados							
PS	Dímero B3			Dímero B6			
	Estaterina	Péptido P-B	Cistinas	Estaterina	Péptido P-B	Cistinas	
$K_{SV} (10^3 M^{-1})$	17,8±1,2 ^{f, g}	11,8±0,7 ^h	5,4±0,3 ^j	40,0±4,1 ^c	14,9±0,8 ^g	6,5±0,2 ⁱ	

Comparando os diferentes valores, de um modo geral, verifica-se que os elagitaninos apresentam constantes de afinidade maiores do que os taninos condensados. Esta tendência está de acordo com o que se encontra já reportado,^{24, 64} em que os taninos hidrolisáveis parecem interagir melhor do que os condensados, e isto poderá estar relacionado com a maior complexidade estrutural dos primeiros. A punicalagina é o tanino com maiores constantes e em especial quando interage com o péptido P-B ($94,1 \times 10^3 M^{-1}$). Em relação aos outros dois elagitaninos, apesar de a castalagina apresentar valores de K_{app} relativamente superiores às da vescalagina, a

magnitude das constantes de afinidade é praticamente idêntica entre si, o que é compreensível tendo em consideração a sua proximidade estrutural. Porém, parece haver a mesma ordem de interação que se observou na punicalagina em relação às PS, uma vez que o péptido P-B apresenta também maiores valores de K_{app} nestes casos. Esta proteína, como já referido, assemelha-se às PRPs na medida em que apresenta um alto teor em resíduos de prolina.⁶⁸ Assim, a sua maior afinidade torna-se de certo modo expectável, uma vez que este tipo de aminoácidos induz uma estrutura mais rígida e aberta da proteína, promovendo uma maior exposição dos seus resíduos apolares passíveis de estabelecerem ligações hidrofóbicas.^{60, 78} Por outro lado, verifica-se que a PS com maior capacidade de interação com as procianidinas é a estaterina, que apresenta valores de K_{SV} de $17,8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ com a B3 e $40,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ com a B6. Esta maior afinidade associada à estaterina poderá estar relacionada com a presença de dois resíduos de serina fosforilados, os quais são capazes de estabelecer ligações hidrofílicas, beneficiando e fortalecendo a interação com taninos mais polares (condensados). Observa-se, de um modo geral, que as cistatinas são as PS que interagem menos, sendo esta observação mais evidente para o caso dos taninos condensados ($5,4 \times 10^3$ e $6,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$). Relativamente a esta classe de taninos, as diferenças de afinidade são de certo modo mais notórias entre estes dois dímeros, sendo que a procianidina B6 apresenta valores de K_{SV} superiores aos da B3, do que entre os isómeros de elagitaninos.

O formato do gráfico de Stern-Volmer apresentado e o modo de cálculo de cada uma destas constantes está intrinsecamente relacionado com o tipo de mecanismo (estático ou dinâmico) associado a cada interação. Por um lado, um gráfico de Stern-Volmer linear normalmente indica que apenas um tipo de mecanismo ocorre, estático ou dinâmico. Enquanto que o primeiro descreve a formação de um complexo estável, o mecanismo dinâmico está relacionado com colisões que ocorrem entre o fluoróforo (PS) e o *quencher* (tanino). Por outro lado, verifica-se um desvio positivo em relação ao eixo dos xx quando a extensão do *quenching* é grande e em duas situações: quando ambos os mecanismos estão presentes em simultâneo ou no caso de existir uma “esfera de ação”. Este último fenómeno ocorre quando o *quencher* se encontra adjacente ao fluoróforo no momento de excitação. Neste caso, para prever qual o tipo de mecanismo envolvido, é necessário calcular os valores de k_q de cada interação que apresenta um gráfico de Stern-Volmer linear. Inerente a este cálculo, o tempo de vida de cada PS teve também de ser determinado e ambos os valores estão dispostos na **Tabela 2**.

Tabela 2. Valores determinados do tempo de vida (τ_0) de cada proteína salivar (PS) e das constantes bimoleculares (k_q) para as interações entre as PS estaterina, péptido P-B e cistatinas, os três elagitaninos (vescalagina, castalagina e punicalagina) e os dois taninos condensados (dímeros B3 e B6).

PS	τ_0 / ns	$k_q (10^{13}) / \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$				
		Elagitaninos			Taninos Condensados	
		Vescalagina	Castalagina	Punicalagina	Dímero B3	Dímero B6
Estaterina	1,73	-*	-*	4,51±0,25	1,03±0,07	2,32±0,02
Péptido P-B	2,55	-*	-*	3,69±0,12	0,46±0,03	0,59±0,03
Cistatinas	4,02	-*	-*	-*	0,135±0,009	0,16±0,01

*Para estas interações não se verificaram gráficos de Stern-Volmer lineares

As interações cujas constantes são superiores ao valor limite controlado por difusão ($1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) apresentam uma maior afinidade e ocorrem pela formação de um complexo (mecanismo estático). Isto foi observado para todas as situações que apresentavam linearidade no gráfico de Stern-Volmer ($k_q \gg 1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), mas em especial no caso das interações da punicalagina com a estaterina e o péptido P-B ($4,51 \times 10^{13}$ e $3,69 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respetivamente). Estes resultados sugerem que o mecanismo mais provavelmente associado a todas estas interações é o estático, no qual se forma um complexo estável entre a PS e o tanino.

Apesar de o tipo de mecanismo estar associado à magnitude de k_q , o mesmo não se pode inferir no caso das interações que revelam um desvio positivo à linearidade, o que se observou para a maior parte das interações inerentes aos elagitaninos. Em alternativa, foram feitos estudos preliminares nos quais foi necessário medir o tempo de vida das PS em função da concentração de taninos. Deste modo, pretendia-se compreender se se trata de uma contribuição de ambos os mecanismos estático e dinâmico ou se a interação ocorre pelo mecanismo de “esfera de ação”. Os resultados obtidos (dados não apresentados) apontam para que seja este último o mais provavelmente associado à extinção da fluorescência nestes casos. No mecanismo de “esfera de ação”, assume-se a existência de uma esfera de volume dentro da qual a diminuição do sinal fluorescente apenas ocorre se o *quencher* se encontrar imediatamente adjacente ao fluoróforo quando existe excitação. Concretizando, se o tanino se encontrar adjacente à PS no momento de excitação, esta não irá emitir fluorescência e verifica-se, então, o fenómeno de *quenching*. Presume-se, assim, que as interações entre os elagitaninos vescalagina e castalagina com todas as PS, mas também entre a punicalagina e as cistatinas, estão relacionadas com um mecanismo de “esfera de ação”. Por fim, é ainda interessante constatar que os dois estereoisómeros elágicos parecem apresentar um mecanismo de interação semelhante para as diferentes PS abordadas.

1.2. STD-NMR

Os estudos de STD-NMR foram realizados com o intuito de prever os epítomos de ligação dos taninos envolvidos nas interações estudadas. Ainda, com esta técnica é também possível estimar os valores de constantes de associação (K_A), para assim ser possível comparar estes valores com os resultados de extinção de fluorescência.

As estruturas dos três elagitaninos (vescalagina,¹⁴⁵ castalagina¹⁴⁶ e punicalagina¹⁴⁷) e das duas procianidinas (dímeros B3¹⁴⁸ e B6¹⁴⁹) foram elucidados por comparação com os desvios químicos de ^1H NMR descritos na literatura.

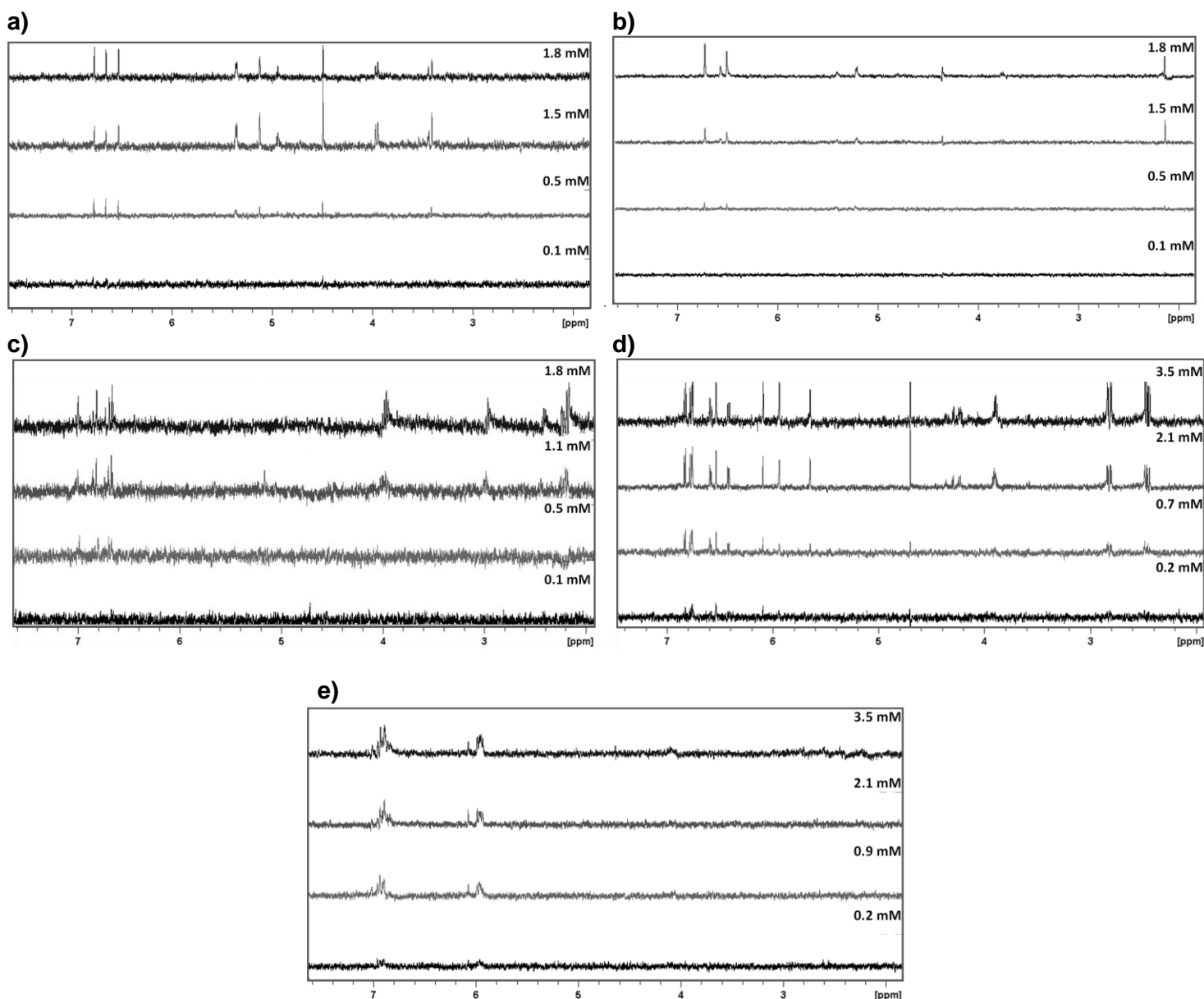


Figura 20. Espectros de STD-NMR para as interações entre duas das PS (3 μM) e concentrações crescentes de cada tanino. A região representada (8,0-2,0 ppm) corresponde à zona em que os prótons apresentavam maior ressonância. Os espectros foram registados a 600 MHz e 300 K em água deuterada /óxido de deutério (D_2O). Interações entre a PS péptido P-B e os elagitaninos **a)** vescalagina, **b)** castalagina, **c)** punicalagina. Interação entre a PS estaterina e as procianidinas diméricas **d)** B3 e **e)** B6.

Previamente, foram realizados ensaios de controlo com elevadas concentrações dos diferentes taninos, de modo a otimizar a potência e frequência de irradiação. Deste modo, pretendia-se assegurar que a frequência de irradiação das análises *on-resonance* não afetava os prótons dos taninos e que a PS seria saturada especificamente. Como resultado, os prótons aromáticos dos taninos não eram visíveis nestas condições de controlo. Depois de serem estabelecidos os parâmetros experimentais a utilizar e de testar várias concentrações das duas espécies intervenientes nas interações, os sinais de STD-NMR apenas puderam ser obtidos para concentrações entre 0,1 mM e 3,5 mM, dependendo do tanino, e 3 μ M de PS. Por conseguinte, os diferentes taninos foram adicionados em concentrações crescentes às três PS em estudo e os respetivos espetros foram registados. A título de exemplo, na **Figura 20** estão representados os espetros da titulação de STD-NMR das interações mais fortes, ou seja, entre os elagitaninos e o péptido P-B [**a**), **b**) e **c**)] e entre os taninos condensados e a estaterina [**d**) e **e**)].

Por análise dos espetros resultantes das interações com os elagitaninos, verifica-se que quando as concentrações de ligando são mais baixas (0,1 a 0,5 mM), os sinais dos primeiros prótons a surgir encontram-se principalmente a 7,0 ppm. Esta região corresponde aos prótons das unidades HHDP e NHTP (ver **Figura 7**, da secção 1.2.2 do capítulo 1. *Introdução*) destas estruturas, sugerindo que estes são os primeiros locais a interagir com as três PS. Seguidamente, à medida que a concentração destes taninos aumenta, começam a surgir sinais nas regiões 4,0 e 3,0 ppm, as quais correspondem aos prótons das unidades de glucose. Relativamente às duas procianidinas estudadas, para todas as PS, verificou-se uma tendência semelhante à dos taninos hidrolisáveis. Neste sentido, no que diz respeito ao dímero B3, os primeiros locais de interação a serem detetados para concentrações mais baixas correspondem aos anéis B e E, enquanto os sinais correspondentes aos anéis A e D apenas foram detetados a concentrações mais elevadas. Porém, estes últimos sinais não se observaram no caso da procianidina dimérica B6, onde apenas as regiões moleculares correspondentes aos anéis B e E parecem interagir com as PS, mesmo para concentrações mais elevadas. O envolvimento dos anéis B e E da procianidina B3 na interação com proteínas foi já reportado em outros estudos, os quais incluem a interação com a tripsina¹⁵⁰ e pequenos péptidos de PRPs.^{151, 152} No entanto, por consulta da literatura, não existem dados que revelem quais os epítomos do dímero B6 na interação com alguma proteína. Relativamente à sua maior seletividade e afinidade de interação, um estudo sugeriu que o dímero com ligações interflavânicas C4→C8 (dímero B3) apresenta uma maior capacidade de interação com algumas PRPs, α -amilase e BSA do que o seu análogo C4→C6 (dímero B6).¹⁰⁰ Porém, como referido, este estudo foi realizado com PS diferentes das que foram aqui abordadas.

Por outro lado, um estudo sensorial atribuiu um maior carácter adstringente à procianidina dimérica B6 em comparação com o seu análogo B3,¹³⁵ o que parece contrariar a ideia anterior e corroborar o que foi aqui demonstrado. Assim, o local em que a ligação interflavânica se estabelece parece ser importante na maior ou menor capacidade de interação destes taninos. Porém, são requeridas análises mais pormenorizadas de modo a estabelecer uma relação mais assertiva.

Para além dos epítodos de interação determinados por STD-NMR, foram também determinadas as constantes de afinidade das mesmas interações tanino-PS estudadas por extinção de fluorescência. Para tal, os prótons que apresentavam sinais de maior intensidade nos espectros de STD-NMR foram integrados e as suas áreas utilizadas para calcular os valores de A_{STD} com base na **equação 3** (ver secção 6 do capítulo *III. Material e Métodos*). Os gráficos resultantes destas análises de titulação expressam os valores de A_{STD} em função da concentração de tanino e estão representados nas **Figuras 21 a 25**.

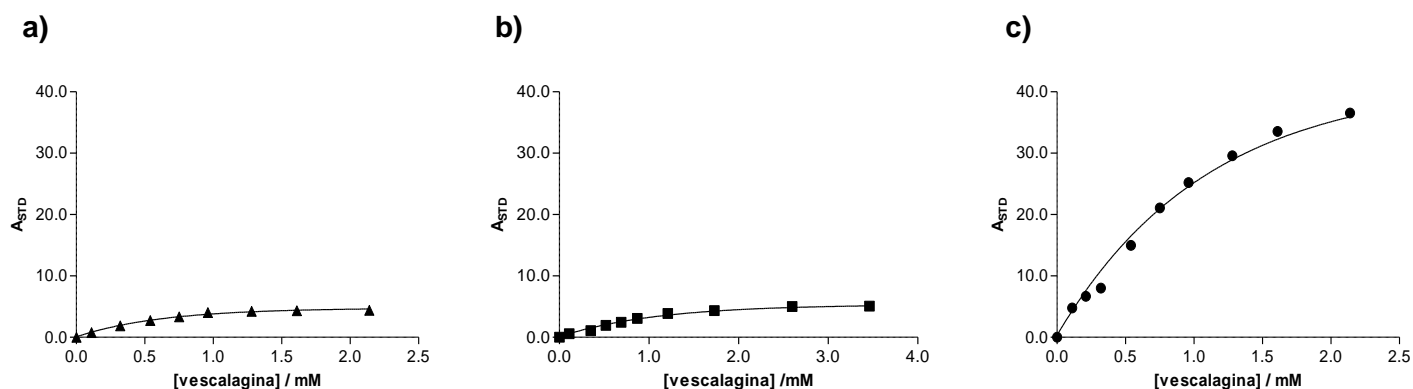


Figura 21. Gráficos representativos dos fatores de amplificação de STD (A_{STD}) para as interações entre concentrações crescentes de vescalagina e as três PS (3 μ M), **a)** estaterina, **b)** péptido P-B, **c)** cistatinas. Os símbolos representam os valores experimentais, enquanto as linhas correspondem aos valores teóricos calculados pela **equação 3**.

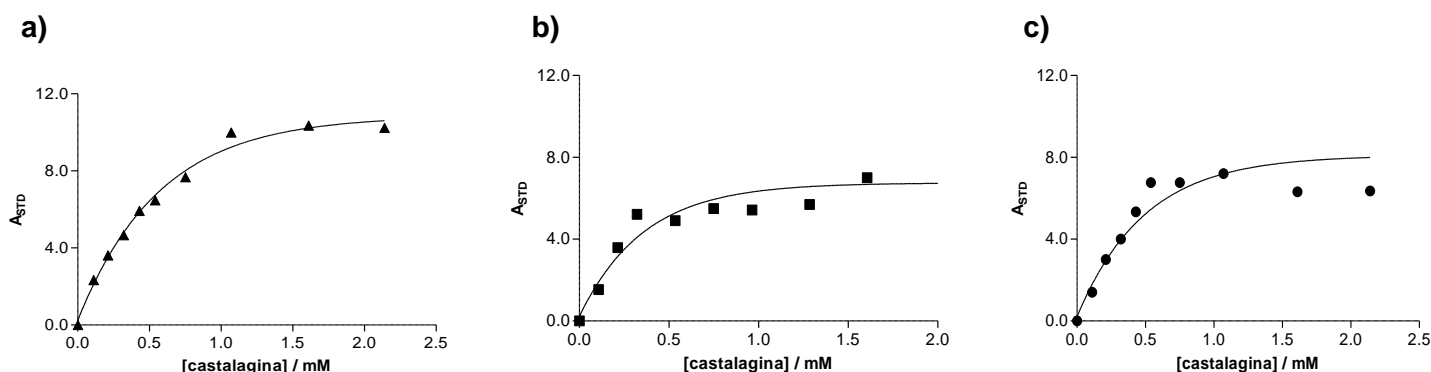


Figura 22. Gráficos representativos dos fatores de amplificação de STD (A_{STD}) para as interações entre concentrações crescentes de castalagina e as três PS (3 μ M), **a)** estaterina, **b)** péptido P-B, **c)** cistatinas. Os símbolos representam os valores experimentais, enquanto as linhas correspondem aos valores teóricos calculados pela **equação 3**.

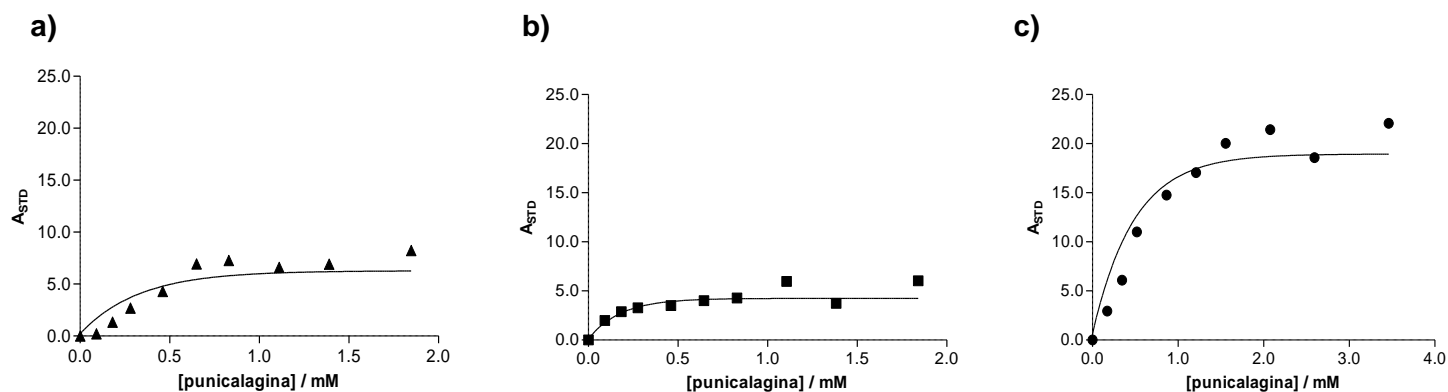


Figura 23. Gráficos representativos dos fatores de amplificação de STD (A_{STD}) para as interações entre concentrações crescentes de punicalagina e as três PS (3 μ M), **a)** estaterina, **b)** péptido P-B, **c)** cistatinas. Os símbolos representam os valores experimentais, enquanto as linhas correspondem aos valores teóricos calculados pela **equação 3**.

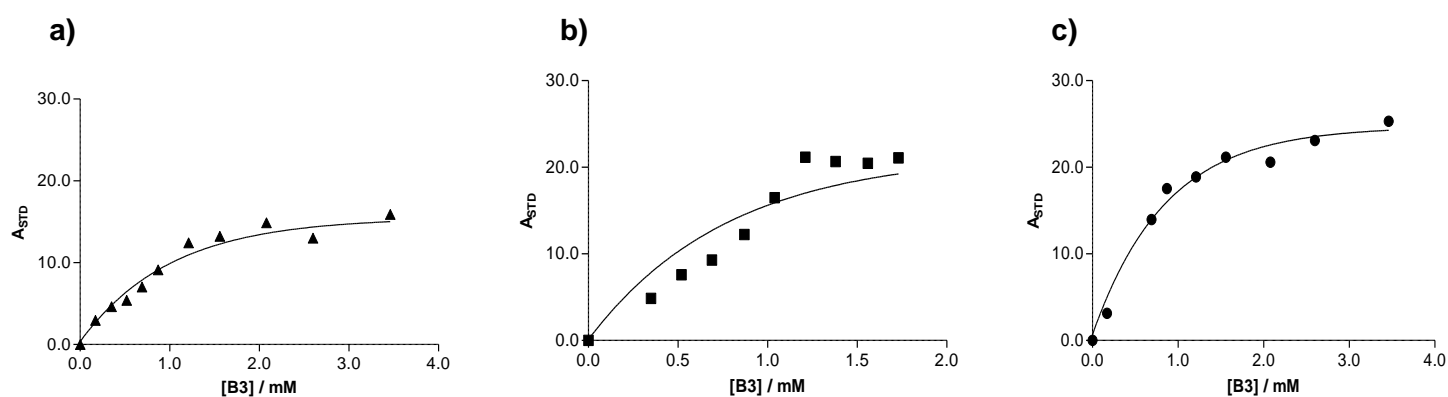


Figura 24. Gráficos representativos dos fatores de amplificação de STD (A_{STD}) para as interações entre concentrações crescentes de procianidina B3 e as três PS (3 μ M), **a)** estaterina, **b)** péptido P-B, **c)** cistatinas. Os símbolos representam os valores experimentais, enquanto as linhas correspondem aos valores teóricos calculados pela **equação 3**.

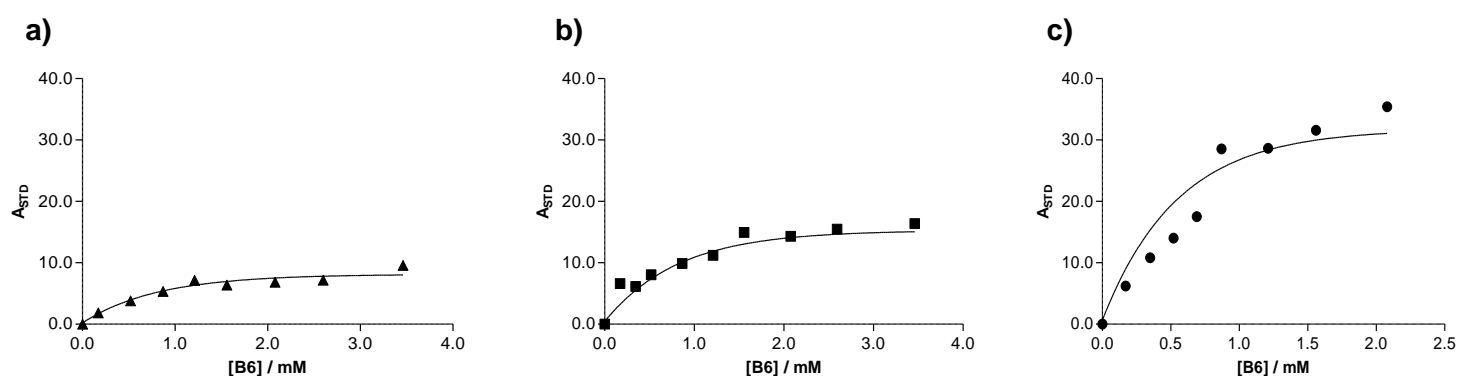


Figura 25. Gráficos representativos dos fatores de amplificação de STD (A_{STD}) para as interações entre concentrações crescentes de procianidina B6 e as três PS (3 μ M), **a)** estaterina, **b)** péptido P-B, **c)** cistatinas. Os símbolos representam os valores experimentais, enquanto as linhas correspondem aos valores teóricos calculados pela **equação 3**.

Observando os gráficos acima representados, verifica-se o aumento sistemático dos sinais de STD com o aumento da concentração de tanino até se atingir um *plateau* representativo da interação máxima. A partir desta estabilização, a PS encontra-se saturada na presença de excesso de ligando e verifica-se que este limite não varia apenas com o tanino utilizado na interação, mas também com a PS em questão. Com base nestes resultados e aplicando as **equações 3 e 4** (ver secção 6 do capítulo *III. Material e Métodos*), os K_A correspondentes a cada interação foram estimados, tendo sido obtidos valores desde $0,7 \times 10^3$ a $8,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, como expresso na **Tabela 3**. No cômputo geral, apesar dos valores determinados se encontrarem todos na mesma magnitude, é possível estabelecer uma ordem relativa das diferentes afinidades, em que $K_A(\text{punicalagina}) > K_A(\text{castalagina}) > K_A(\text{vescalagina})$ e $K_A(\text{procianidina B6}) > K_A(\text{procianidina B3})$. Ainda, é possível reter que genericamente, os taninos hidrolisáveis apresentam constantes maiores do que os condensados. É de salientar que estas duas relações foram igualmente estabelecidas nos estudos de extinção de fluorescência descritos no tópico anterior. Em particular, a K_A mais elevada obtida envolveu um elagitanino, referente à interação entre a punicalagina e o péptido P-B ($8,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$), enquanto que no caso dos taninos condensados, a K_A maior foi de $2,7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, para a interação entre a procianidina dimérica B6 e a estaterina. Novamente, estes resultados corroboram os de extinção de fluorescência, apesar de os valores das constantes obtidas por STD-NMR serem mais baixos que os obtidos pela outra técnica espectroscópica. Contudo, é de referir que as concentrações impostas por cada método diferem consideravelmente, sendo que a extinção de fluorescência permitiu utilizar concentrações de tanino inferiores (até $50,0 \mu\text{M}$) às do STD-NMR (até $3,5 \text{ mM}$).

Comparando a influência relativa das diferentes PS abordadas, verifica-se, por um lado, que as interações com o péptido P-B apresentam valores de K_A superiores com os elagitaninos, com exceção da vescalagina. Este tanino apresentou, ainda que com pouca diferença, maior afinidade para a estaterina. Por outro lado, confirmou-se que a estaterina é a PS que revelou K_A mais altos quando as interações envolvem as procianidinas diméricas analisadas. Além deste resultado estar concordante com os ensaios de extinção de fluorescência, vai também de encontro com outros estudos da literatura⁵¹ que reportam a estaterina como uma das PS que melhor interage com os taninos condensados. Ainda, a ideia de as cistatinas estarem associadas aos menores valores de K_A obtidos parece ser inerente a quase todos os taninos abordados, excluindo a castalagina e a procianidina B3 que, apesar de novamente a diferença não ser muito óbvia, apresentam menor afinidade para a estaterina e o péptido P-B, respetivamente.

Tabela 3. Valores de constantes de associação (K_A) estimados para as interações entre cada uma das três proteínas salivares (PS) e os diferentes taninos, considerando as equações 3 e 4.

PS	$K_A (10^3 M^{-1})$				
	Elagitaninos			Taninos Condensados	
	Vescalagina	Castalagina	Punicalagina	B3	B6
Estaterina	1,6*	1,7***	3,3*	1,7***	2,7*
Péptido P-B	1,4*	3,3*	8,3*	1,1**	1,8*
Cistatinas	0,7**	2,2**	2,6*	1,2**	1,6**

Confiança do *fitting*: *≥97%, **≥93%, ***≥80%

1.3. Principais inferências

Em resumo, refletindo sobre as constantes de afinidade obtidas pelas técnicas de extinção de fluorescência e STD-NMR, verifica-se que estes dois métodos em colaboração permitem caracterizar a interação tanino-PS, na medida em que os resultados obtidos estão de acordo entre si. As principais conclusões decorrentes destas análises indicam que as estruturas das duas espécies intervenientes nas interações são essenciais para estas serem estabelecidas e que isto também depende da hidrofobicidade dos compostos polifenólicos.

No geral, verificou-se que a capacidade de interação dos elagitaninos (vescalagina, castalagina e punicalagina) com as três PS em estudo (estaterina, péptido P-B e cistatinas) é comparativamente maior do que a dos taninos condensados (procianidinas diméricas B3 e B6). É possível relacionar esta diferença de afinidade com a estrutura distinta das duas classes de taninos, considerando que os elagitaninos são geralmente moléculas mais apolares e, por isso, mais propensos a estabelecer interações hidrofóbicas do que os taninos condensados.⁵¹ O fator de hidrofobicidade torna-se importante na compreensão dos resultados na medida em que este tipo de interações é considerado uma das forças principais envolvidas nas interações tanino-PS,¹ como já referido. Para além disto, a maior afinidade dos elagitaninos observada foi referente ao péptido P-B, o qual se diferencia das outras PS principalmente pelo seu maior conteúdo em resíduos de prolina. Uma vez mais, a estrutura da PS parece justificar esta tendência, visto que o referido aminoácido é importante para os taninos mais apolares estabelecerem interações e crucial na formação de *stacking* hidrofóbico. Assim, os resultados corroboram a ideia de que as ligações hidrofóbicas são significativamente mais importantes para a interação dos taninos hidrolisáveis em comparação com os condensados, como já proposto por outros autores.^{1, 89} Não obstante, os resultados referentes à vescalagina aproximam-se mais dos dos taninos condensados na medida em que as constantes de afinidade são inferiores à dos outros elagitaninos. Considerando o maior carácter hidrofílico

da vescalagina comparativamente com a castalagina,¹⁵³ por exemplo, compreende-se que as interações hidrofóbicas possam ser menos significativas o que, consequentemente, explica a menor afinidade do primeiro estereoisómero.

Ainda, relativamente às menores interações experienciadas pelos taninos condensados, observou-se que a procianidina B6 apresenta maior afinidade relativamente ao seu isómero B3. Relacionado esta desigualdade com a estrutura de cada uma, estudos moleculares mecanísticos^{154, 155} revelaram que a ligação C4→C6 (presente no caso do dímero B6) apresenta uma grande diversidade de conformeros e proporciona estruturas mais alongadas, o que se reflete numa maior flexibilidade comparando com a ligação C4→C8 (inerente ao dímero B3). Em relação à influência da estrutura das diferentes PS, verifica-se que este fator parece ser também importante na interação com os taninos condensados. Mais concretamente, a estaterina apresenta os maiores valores de constantes de afinidade, sendo que a explicação mais provável para este caso se baseia no carácter hidrofílico destes taninos, como referido anteriormente para o caso da vescalagina. Por outro lado, as cistatinas foram as PS com maior organização estrutural entre as três analisadas e, ao mesmo tempo, as com menor afinidade para todos os cinco taninos. A redução da capacidade de interação tanino-PS com o aumento da estrutura das proteínas registado poderá estar associado ao facto de neste caso o acesso dos taninos aos aminoácidos mais hidrofóbicos encontrar-se limitado e a disponibilidade dos aminoácidos à superfície ser reduzida.

2. Estudos de copigmentação

Os efeitos de promoção e estabilização da cor que o fenómeno de copigmentação proporciona em vários complexos antociânicos são já conhecidos e bastante reportados na literatura.^{12, 33, 37} No entanto, o modo como este processo poderá influenciar uma maior ou menor interação entre diferentes classes de compostos fenólicos e PS é ainda totalmente desconhecido. Assim, com o intuito de compreender melhor o impacto dos complexos antocianina-tanino na interação com as PS e as suas consequências na perceção da adstringência, foram realizados ensaios utilizando duas técnicas complementares, STD-NMR e ITC. Como objeto de estudo analisaram-se duas das PS mais abundantes na saliva e mencionadas na literatura como mais envolvidas na adstringência, as bPRPs e as aPRPs. Preliminarmente, estas foram sujeitas à interação isolada com dois dos polifenóis mais simples representativos de duas classes, taninos e antocianinas: (-)-epicatequina e malvidina-3-O-glucósido, respetivamente (**Figura 26**). Posteriormente, o efeito destes dois compostos em cooperação, numa proporção 1:1, foi testado também pelas mesmas técnicas e os resultados subsequentes comparados.

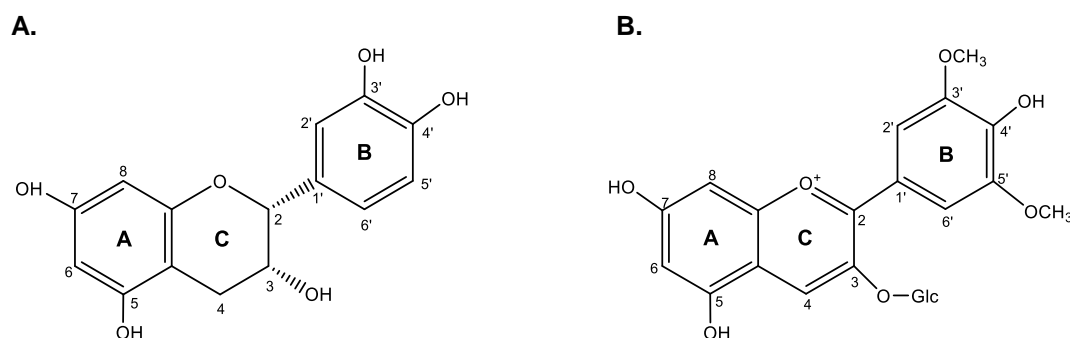


Figura 26. Estruturas químicas dos polifenóis escolhidos para representar as duas classes de polifenóis, taninos e antocianinas. **A** | (-)-epicatequina e **B** | malvidina-3-O-glucósido. A abreviação “Glc” refere-se à substituição do grupo na posição 3 do anel C por uma unidade de glucose.

Para além disso, sabe-se que o pH é um fator crucial pelo facto de as antocianinas poderem apresentar várias formas em solução dependendo da acidez do meio e, consequentemente, influenciar a estabilidade e capacidade de interação das antocianinas. Uma vez que os protões das diferentes formas presentes em equilíbrio em solução são visíveis na técnica de STD-NMR, foi necessário restringir o pH da solução em estudo, de modo a simplificar o espectro resultante das análises referentes à malvidina-3-O-glucósido. Assim, o pH de todas as soluções foi ajustado a 1,0, de modo a garantir que a forma predominante em solução seja o catião flavílio. Porém, a técnica de ITC não apresenta estas restrições e foi assim possível estudar o efeito do fenómeno de copigmentação a dois valores de pH diferentes. Como método de comparação com os resultados de STD-NMR, numa das interações o pH foi mantido a 1,0, enquanto numa segunda situação as soluções foram ajustadas a 3,5-4,0, de modo a mimetizar os valores próximos dos encontrados na boca após a ingestão de vinho.¹⁵⁶

2.1. STD-NMR

A técnica de STD-NMR é, comparativamente com a de ITC, menos sensível, permitindo estudar rácios ligando-proteína ($[L]/[P]$) consideravelmente maiores. Assim, a sensibilidade relativa deste método na obtenção de constantes de afinidade pode ser considerada uma desvantagem, apesar de poder ser utilizada como modelo comparativo e poder obter-se uma ideia geral das interações estabelecidas. Além disto, o processo de análise dos espectros pode tornar-se ainda mais complicado nas presentes condições de estudo, uma vez que envolve um sistema complexo de dois ligandos. Porém, este método permite definir com alguma segurança possíveis epítomos de ligação, possibilitando uma melhor compreensão do tipo de interações que poderão estar envolvidas. Deste modo, apesar de terem sido determinados valores de K_A para as diferentes interações, a principal

intenção destes estudos foi tentar elucidar quais os locais aparentemente mais predispostos para a interação das PS nas diferentes condições de ligandos.

Os ensaios de STD-NMR foram realizados com os mesmos cuidados referidos anteriormente, tendo sido testadas previamente concentrações mais elevadas dos ligandos para garantir que a frequência de radiação específica para as duas famílias de PS não afetaria as estruturas da (-)-epicatequina e malvidina-3-O-glucósido. Estas, por sua vez, foram consideradas tendo em conta os respetivos desvios químicos de ^1H NMR já descritos.^{157, 158} Após assegurar as condições desejadas, foram estabelecidas 9 concentrações para cada um dos polifenóis, mantendo o rácio 1:1 no caso da mistura tanino-antocianina. Assim, foram utilizadas as concentrações de 345 μM , 689 μM , 1033 μM , 1723 μM , 2412 μM , 3101 μM , 4134 μM , 5168 μM e 6890 μM para cada um dos ligandos, enquanto que a concentração das PS foi mantida constante a 9 μM . Os ligandos foram, então, adicionados a esta concentração fixa de PS, em concentrações crescentes e os respetivos gráficos de titulação foram obtidos, como exemplificado na **Figura 27**.

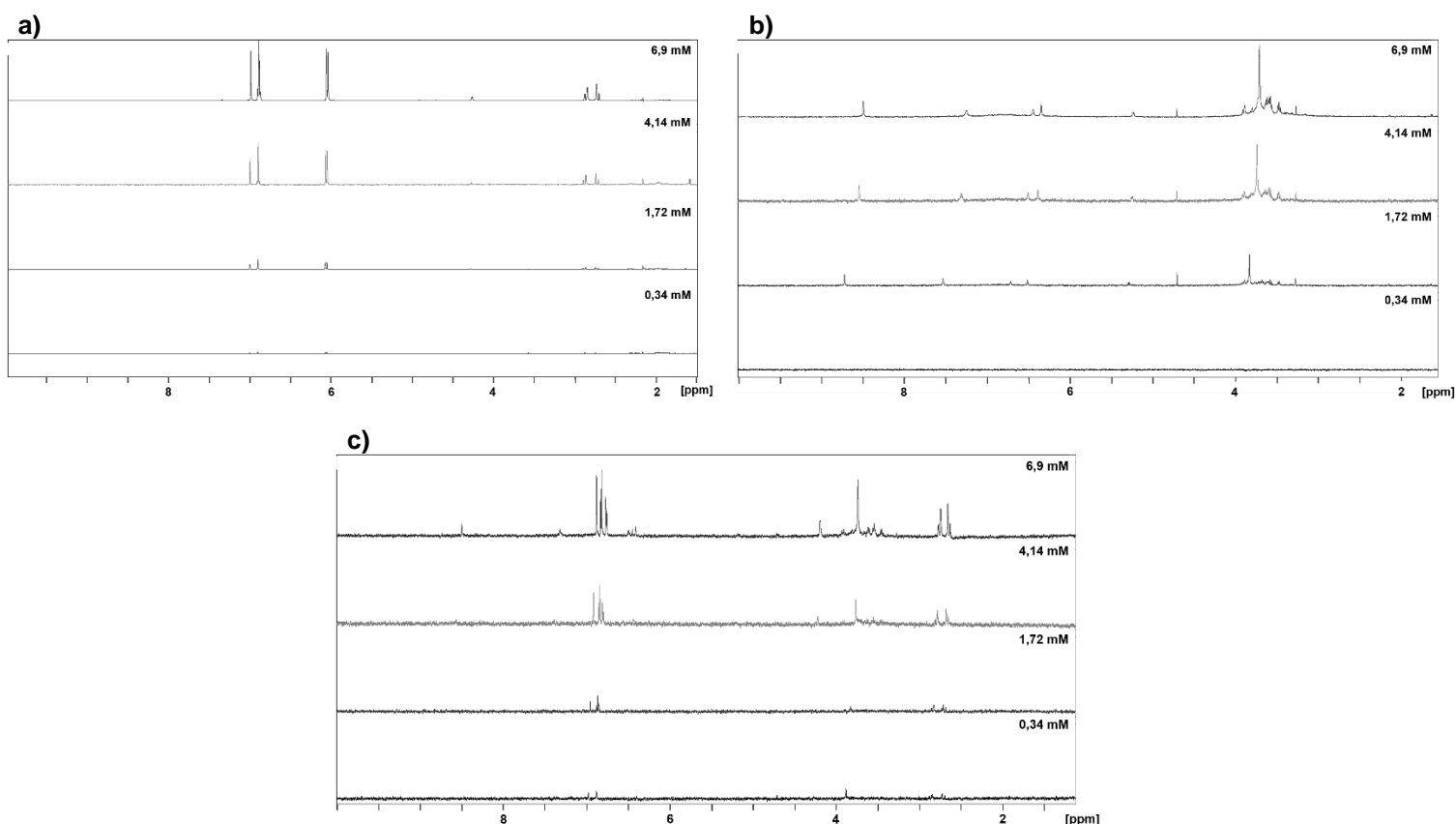


Figura 27. Espetros de STD-NMR para as interações entre as duas PS (9 μM) e concentrações crescentes de cada ligando. A região representada (9,0-2,0 ppm) corresponde à zona em que os protões apresentavam maior ressonância. Os espetros foram registados a 600 MHz e 300 K em água deuterada/óxido de deutério (D_2O). Interações entre as PS aPRPs e **a)** (-)-epicatequina, **b)** malvidina-3-O-glucósido e **c)** mistura (-)-epicatequina+malvidina-3-O-glucósido.

Por análise dos espectros de STD-NMR, acima exemplificados, verifica-se que para concentrações mais baixas de (-)-epicatequina, os primeiros prótons a surgir correspondem às posições 6 e 8 do anel A (6,0 ppm) e 5' e 6' do anel B (7,0 ppm), sugerindo que estes serão os primeiros locais a interagir tanto com as bPRPs como com as aPRPs. À medida que a concentração de ligando aumenta, ocorre também um aumento destes sinais e começam a surgir outros sinais na região 2,8 ppm, a qual corresponde aos prótons da posição 4 do anel C, novamente para ambas as PS. Relativamente à malvidina-3-O-glucósido, observa-se uma situação idêntica na medida em que também se verifica um incremento dos sinais relativos às regiões 6,0 e 7,0 ppm (posições 6 e 8 do anel A). No entanto, neste caso os primeiros sinais a surgir correspondem aos prótons das unidades de glucose da posição 3 do anel C (regiões 3,0 e 4,0 ppm), apontando uma preferência de interação para estes prótons. Os referidos sinais foram também intensificados à medida que a concentração de antocianina aumentava. Novamente, mas agora respeitante à mistura tanino-antocianina, os primeiros sinais a surgir a concentrações baixas de ligando correspondem às regiões 3,0 e 4,0 ppm dos prótons das unidades de glucose da malvidina-3-O-glucósido. Ainda, a região 2,8 ppm referente aos prótons da posição 4 do anel C da (-)-epicatequina também revelam alguns sinais. No entanto, os sinais referentes às regiões 6,0 e 7,0 ppm das posições 6 e 8 do anel A tanto da (-)-epicatequina como da malvidina-3-O-glucósido são também visíveis. Todas estas observações foram praticamente iguais tanto para as bPRPs como para as aPRPs, não se verificando uma diferença óbvia relativamente a nenhuma PS em particular. Esta será a primeira vez que os epítomos de ligação dos dois ligandos estudados são determinados por STD-NMR.

A análise dos espectros apresentados anteriormente foi realizada considerando os prótons de cada ligando cujos sinais fossem os mais intensos coincidentes para ambos os polifenóis estudados e que apresentassem uma vizinhança o mais semelhante possível. Deste modo, foram escolhidos os prótons H6 e H8 do anel A da (-)-epicatequina e da malvidina-3-O-glucósido. Nos casos da (-)-epicatequina e mistura tanino-antocianina, não se observou um desdobramento destes dois prótons e, portanto, a integração foi realizada em conjunto, apresentando um único valor de K_A . Por outro lado, no caso da malvidina-3-O-glucósido verificou-se o desdobramento dos prótons, sendo feita a integração separada de cada um dos prótons. Dado que os dois apresentaram um comportamento idêntico e revelaram valores de K_A também semelhantes, os resultados aqui evidenciados são referentes a apenas um dos prótons (H8).

Considerando os espectros anteriormente representados, as curvas de titulação que traduziam o efeito do aumento da concentração de polifenol para uma concentração

fixa de PS (9 μ M) foram traçadas pela extrapolação dos valores de A_{STD} calculados a partir da **equação 3** (ver secção 6 do capítulo *III. Material e Métodos*). Os gráficos referentes a estas titulações estão representados nas **Figuras 28 a 30**, correspondendo às interações das duas PS (bPRPs e aPRPs) com cada um dos polifenóis [(-)-epicatequina e malvidina-3-O-glucósido] e mistura tanino-antocianina para os protões indicados.

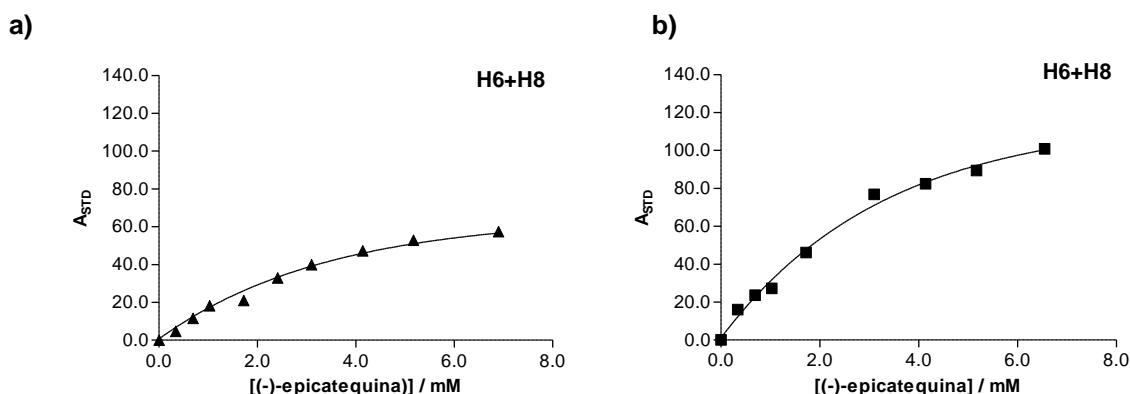


Figura 28. Gráficos representativos dos fatores de amplificação de STD (A_{STD}) para as interações entre concentrações crescentes de (-)-epicatequina e as duas PS (9 μ M), **a)** bPRPs e **b)** aPRPs. Os símbolos representam os valores experimentais, enquanto as linhas correspondem aos valores teóricos tendo em conta a **equação 3**.

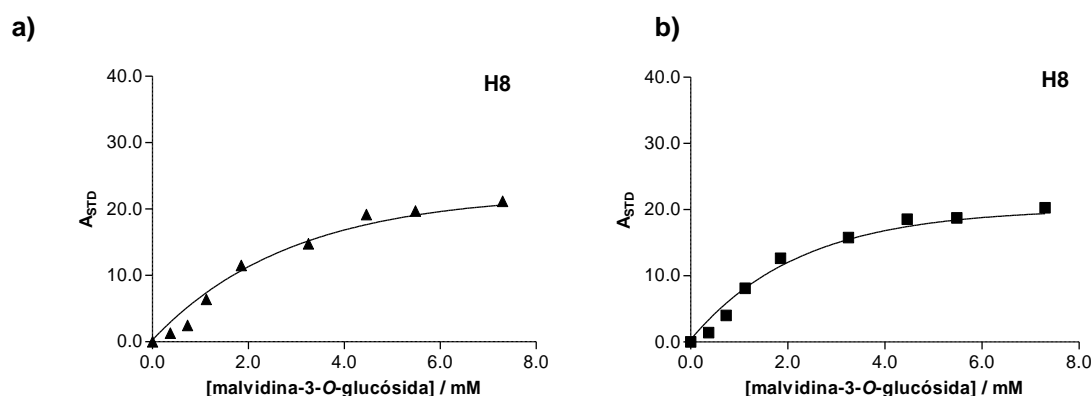
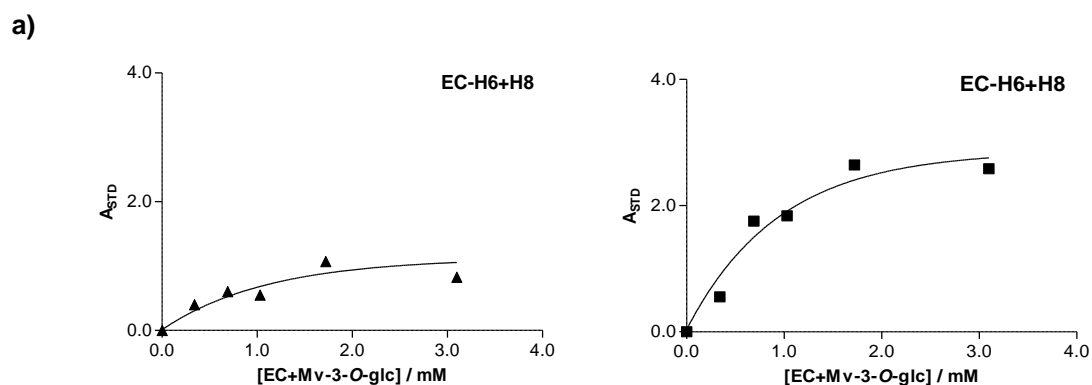


Figura 29. Gráficos representativos dos fatores de amplificação de STD (A_{STD}) para as interações entre concentrações crescentes de malvidina-3-O-glucósido e as duas PS (9 μ M), **a)** bPRPs e **b)** aPRPs. Os símbolos representam os valores experimentais, enquanto as linhas correspondem aos valores teóricos tendo em conta a **equação 3**.



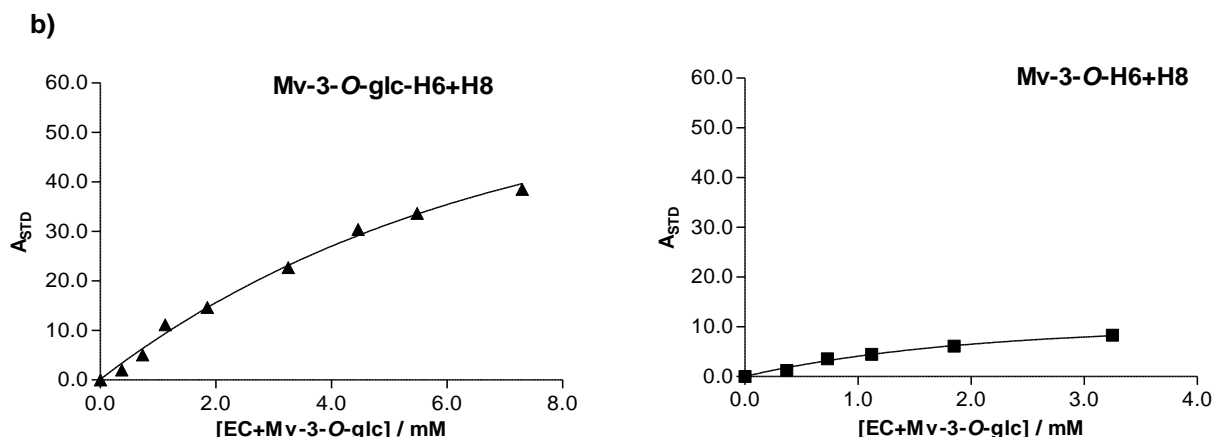


Figura 30. Gráficos representativos dos fatores de amplificação de STD (A_{STD}) para as interações entre concentrações crescentes da mistura (-)-epicatequina+malvidina-3-O-glucósido (EC+Mv-3-O-glc) e as duas PS (9 μ M), bPRPs (\blacktriangle) e aPRPs (\blacksquare). Os símbolos representam os valores experimentais, enquanto as linhas correspondem aos valores teóricos tendo em conta a **equação 3**. Os *fitting* das curvas foram realizados considerando os prótons referentes à **a)** (-)-epicatequina (EC) e **b)** malvidina-3-O-glucósido (Mv-3-O-glucósido) separadamente.

Verifica-se que todas as curvas de titulação representadas aumentam até ser atingido um *plateau* correspondente à saturação dos epítomos de ligação das PS pelo excesso de ligando presente. A partir deste patamar máximo alcançado, cuja intensidade e concentração de ligando correspondente varia conforme a interação polifenol-PS em questão, não se observa uma variação significativa do sinal A_{STD} . Por aplicação das **equações 3 e 4** (ver secção 6 do capítulo *III. Material e Métodos*) às curvas representadas nas **Figuras 28-30**, foi possível determinar os respetivos valores de K_A , os quais se encontram sumarizados na **Tabela 4**.

Tabela 4. Valores de constantes de associação (K_A) estimados para as interações entre cada uma das duas proteínas salivares (PS) e os diferentes ligandos, considerando as **equações 3 e 4**.

PS	K_A (10^3 M $^{-1}$)			
	H6+H8	H8	EC-H6+H8	Mv-H6+H8
	(-)-epicatequina	Mv-3-O-glc	EC + Mv-3-O-glc	
bPRPs	0,23**	0,29*	0,80*	0,10*
aPRPs	0,23***	0,42*	1,01*	0,38*

Confiança do *fitting*: * $\geq 98\%$, ** $\geq 95\%$ *** $\geq 89\%$

As constantes obtidas encontram-se entre $0,23 \times 10^3$ e $1,01 \times 10^3$ M $^{-1}$, não apresentando grandes diferenças de magnitude. No entanto, verifica-se uma maior predisposição, apesar de pequena, das interações que envolvem as aPRPs relativamente às bPRPs para todos os ligandos, por as primeiras apresentarem constantes sensivelmente maiores. Comparando os valores de K_A obtidos para os dois polifenóis, verifica-se que a malvidina-3-O-glucósido ($0,29 \times 10^3$, e $0,42 \times 10^3$ M $^{-1}$) parece interagir com

maior eficácia com ambas as PS do que a (-)-epicatequina ($0,23 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$). Porém, considerando as constantes relativas a cada uma das moléculas quando o fenómeno de copigmentação está presente, a situação anteriormente referida parece inverter-se. Ou seja, os valores de K_A são superiores no caso da análise dos protões correspondentes à (-)-epicatequina ($1,01 \times 10^3$ e $0,80 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) do que dos da malvidina-3-O-glucósido ($0,10 \times 10^3$ e $0,38 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$). Isto parece, assim, indicar que quando os dois compostos polifenólicos estão presentes existe uma sinergia entre eles, sendo que a (-)-epicatequina será a que mais contribui para a interação com ambas as PS. Nesta situação da mistura tanino-antocianina, verifica-se que, no geral, os valores das constantes são superiores aos dos dois polifenóis a interagir separadamente. Ainda, as diferenças entre as duas PS são mais significativas neste caso da mistura, confirmando-se a maior preferência das aPRPs comparativamente com as bPRPs. Deste modo, sugere-se que o efeito de copigmentação favorece a interação com ambas as PS, principalmente pelo aumento da afinidade da (-)-epicatequina.

2.2. ITC

As análises por ITC permitiram obter os termogramas representados nas **Figuras 31 a 34**, resultantes das interações de duas PS (bPRPs e aPRPs) com as diferentes conjugações de ligandos [(-)-epicatequina, malvidina-3-O-glucósido e mistura (-)-epicatequina-malvidina-3-O-glucósido]. Tal como referido, as interações foram estudadas a duas condições diferentes de pH 1,0 e 3,5-4,0. No entanto, para o caso da (-)-epicatequina, só foi possível obter um termograma a pH 1,0 para a interação com bPRPs (**Figura 31.A**). Isto poderá estar relacionado com a menor capacidade de interação que este tanino apresenta para as duas PS abordadas, sendo que a técnica de ITC não terá sensibilidade suficiente para detetar um sinal nestas situações e assim traçar um termograma. Os valores em abcissas (rácio $[L]/[P]$) correspondem aos diferentes rácios entre as concentrações de ligando (tanino, antocianina e mistura) e as duas PS, aumentando de acordo com a adição de ligando ao longo do tempo.

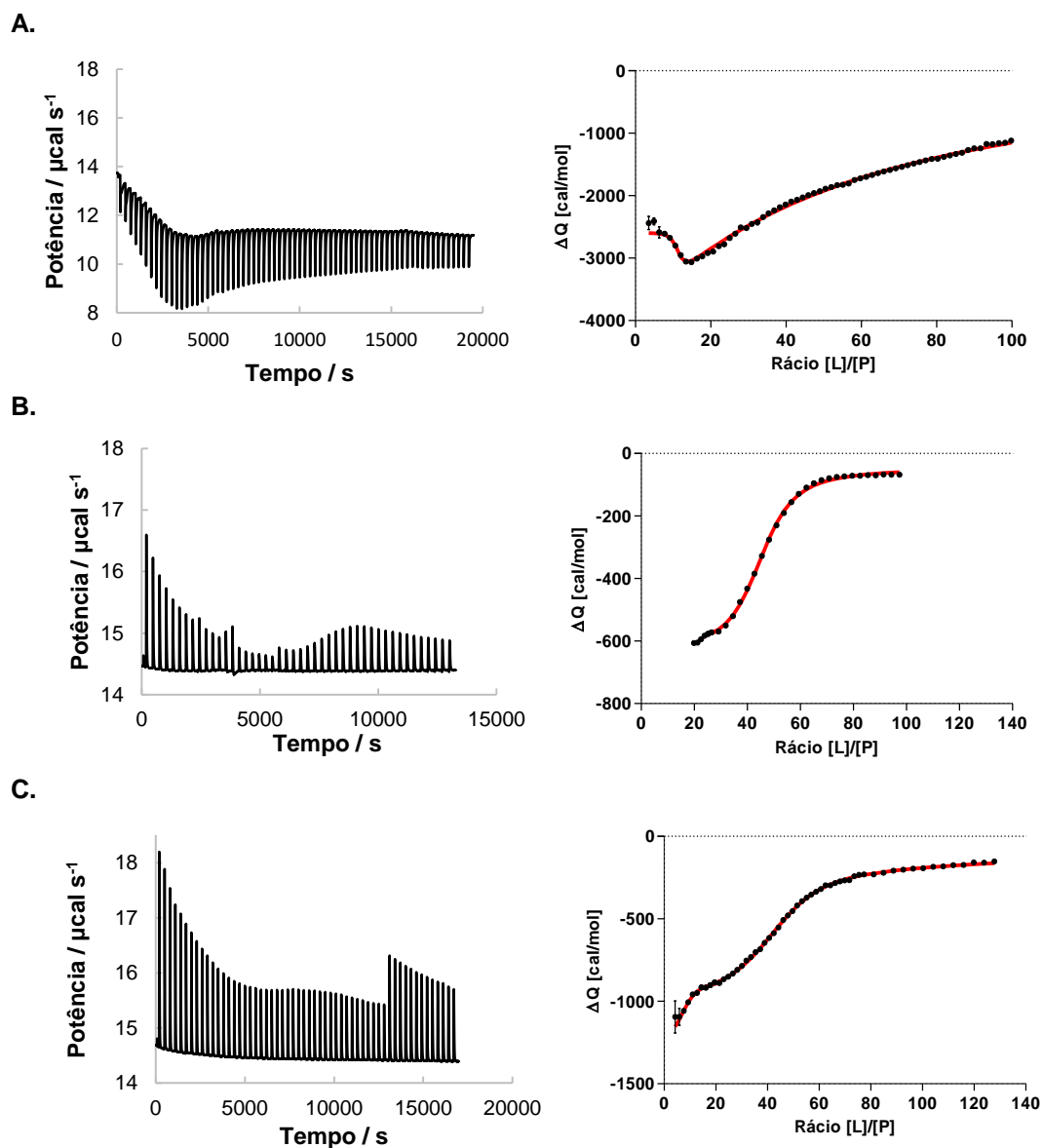


Figura 31. Interações por ITC referentes às bPRPs (20 μ M) a pH 1,0. À esquerda estão representados os termogramas, enquanto que à direita se encontram os gráficos consequentes do *fitting* (linhas a vermelho) dos pontos experimentais (pontos a preto). As interações foram realizadas com três ligandos: **A** | (-)-epicatequina, **B** | malvidina-3-O-glicosida e **C** | 1:1 (-)-epicatequina:malvidina-3-O-glicosido.

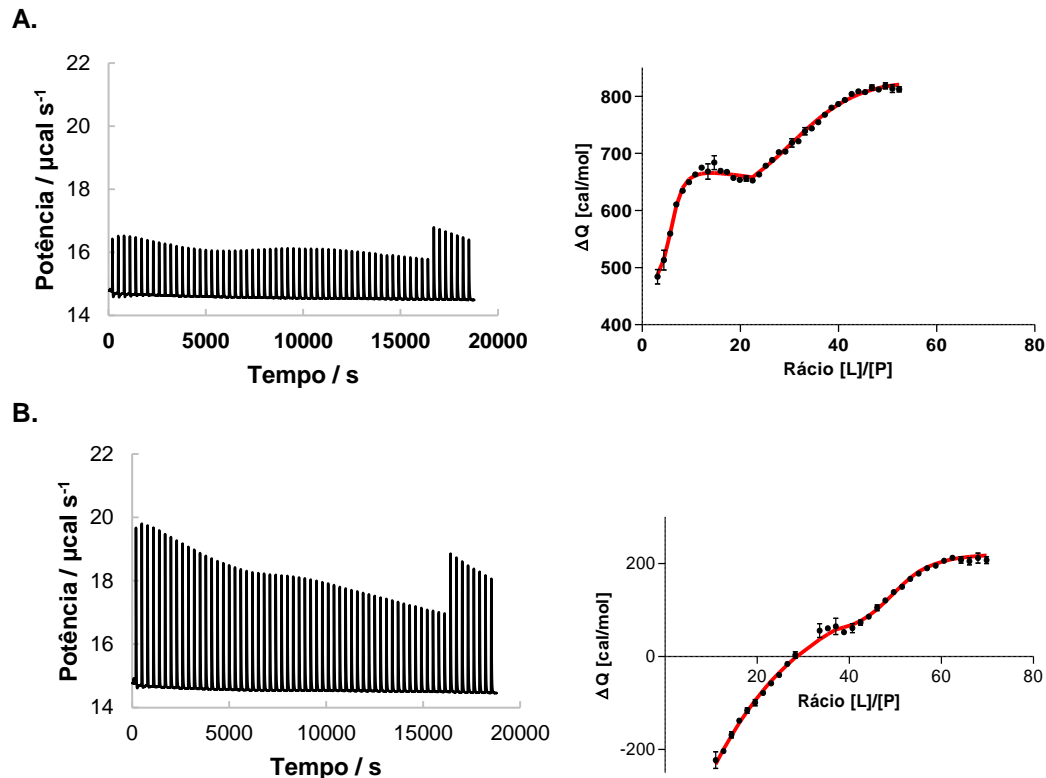


Figura 32. Interações por ITC referentes às bPRPs (20 μM) a pH 3,5-4,0. À esquerda estão representados os termogramas, enquanto que à direita se encontram os gráficos consequentes do *fitting* (linhas a vermelho) dos pontos experimentais (pontos a preto). As interações foram realizadas com dois ligandos: **A** | malvidina-3-O-glicósida e **B** | 1:1 (-)-epicatequina:malvidina-3-O-glucósido.

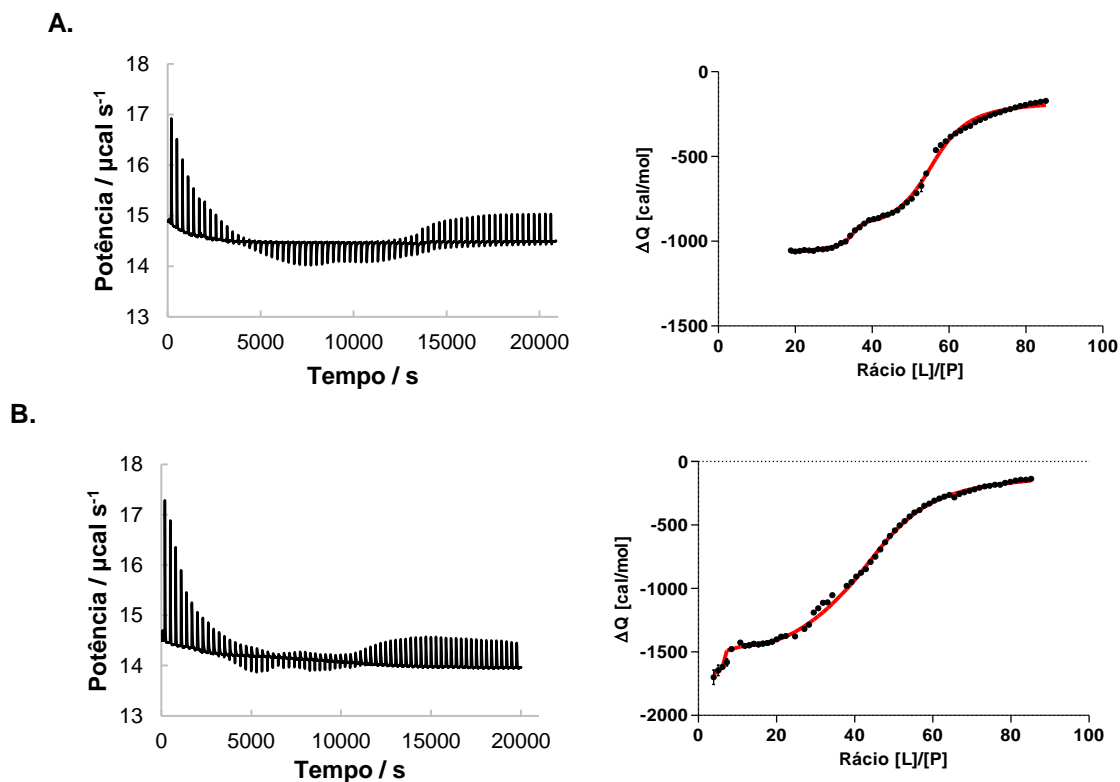
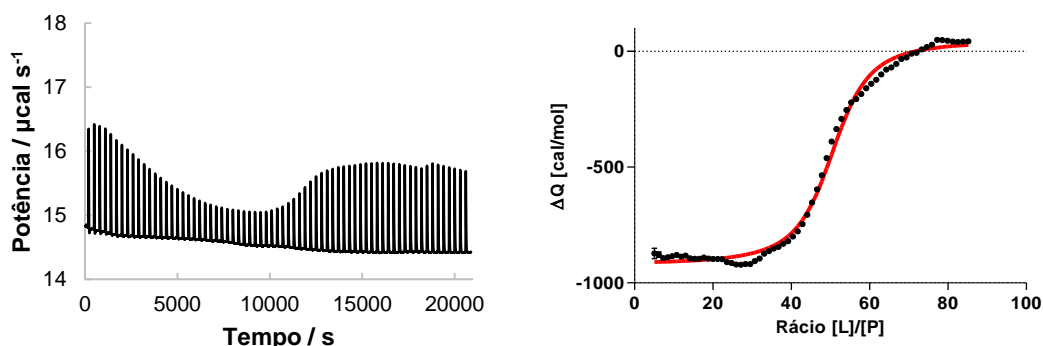


Figura 33. Interações por ITC referentes às aPRPs (30 μM) a pH 1,0. À esquerda estão representados os termogramas, enquanto que à direita se encontram os gráficos consequentes do *fitting* (linhas a vermelho) dos pontos experimentais (pontos a preto). As interações foram realizadas com dois ligandos: **A** | malvidina-3-O-glicósida e **B** | 1:1 (-)-epicatequina:malvidina-3-O-glucósido.

A.



B.

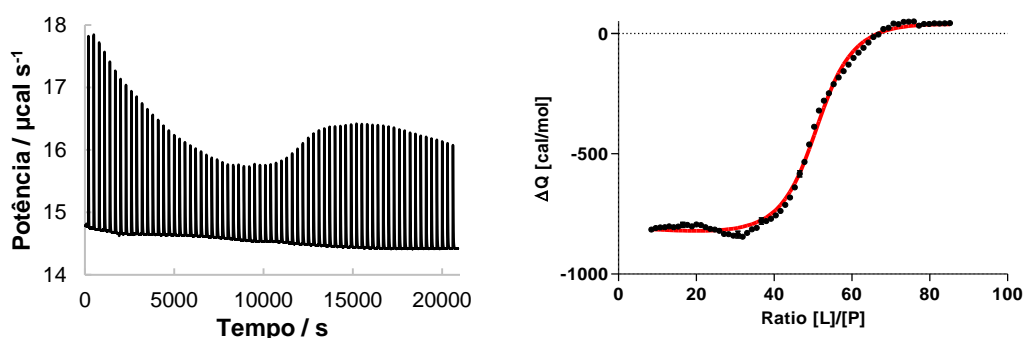


Figura 34. Interações por ITC referentes às aPRPs (30 μ M) a pH 3,5-4,0. À esquerda estão representados os termogramas, enquanto que à direita se encontram os gráficos consequentes do *fitting* (linhas a vermelho) dos pontos experimentais (pontos a preto). As interações foram realizadas com dois ligandos: **A** | malvidina-3-O-glicósida e **B** | 1:1 (-)-epicatequina:malvidina-3-O-glucósido.

Observa-se um comportamento semelhante para quase todas as interações no que diz respeito ao tipo da curva de *fitting*, estabelecendo-se uma curva sigmoidal com dois patamares de estabilização (*plateaus*), com exceção da interação referente às bPRPs com (-)-epicatequina a pH 1,0 [Figura 31. a)] e às aPRPs a pH 3,5-4,0 (Figura 34). À luz do modelo proposto para a interação tanino-proteína, estes *plateaus* poderão corresponder à saturação dos locais de ligação da proteína, sendo que nestas situações a adição de polifenóis à interação não alterará muito a energia gerada e detetada pelo aparelho de ITC.

De um modo geral, registou-se uma maior libertação de energia (maior variação dos valores de ΔQ) no caso da mistura em comparação com os dois ligandos (tanino e antocianina) a interagirem separadamente com as PS. Porém, verifica-se que os rácios [L]/[P] em que se atingem as duas estabilizações variam conforme a interação em questão. Relativamente à interação das bPRPs a pH 1,0 (Figura 31), verifica-se que os patamares obtidos para a mistura tanino-antocianina se estabelecem a rácios [L]/[P] próximos de 20 e 70, aproximando-se dos mesmos valores observados na situação em que apenas a malvidina-3-O-glucósido está presente. Porém, quando há um aumento dos valores de pH para 3,5-4,0 (Figura 32), os rácios observados em cada patamar alteram-

se. Há também uma distinção entre as situações em que só a antocianina se encontra a interagir com a PS (15 e 50) e quando a (-)-epicatequina se encontra também presente (40 e 70). Este efeito do pH não parece ser tão significativo nos rácios das interações quando estas são estabelecidas com as aPRPs (**Figuras 33 e 34**). Ainda, também não se verifica grande alteração dos rácios referentes às estabilizações quando a mistura dos dois polifenóis é estudada, mantendo-se em 20 e 70 a pH 1,0 (**Figura 33**).

O *fitting* dos pontos experimentais de ITC foi feito pelo modelo de dois locais de ligação independente. Deste modo, os estudos por ITC permitiram determinar o número de locais de ligação (*n*) de dois *sets* de ligação (1,2 e 2,2) e as respetivas constantes de ligação (K_A), sendo assim possível caracterizar e comparar as diferentes interações. Os referidos valores encontram-se sumarizados na **Tabela 5**.

Tabela 5. Número de locais de ligação na PS (*n*) e valores de constantes de ligação (K_A) para as interações da (-)-epicatequina, malvidina-3-O-glucósido e a mistura 1:1 destes dois polifenóis (EC+Mv-3-O-glc) com as duas PS estudadas (bPRPs e aPRPs) a **A** | pH 1,0 e **B** | pH 3,5-4,0. A coluna *Set* (1,2 ou 2,2) corresponde aos parâmetros individuais de cada *set* de locais de ligação.

A. pH 1,0							
PS	Set	(-)-epicatequina		malvidina-3-O-glucósido		EC + Mv-3-O-glc	
		<i>n</i>	$K_A (10^5 M^{-1})$	<i>n</i>	$K_A (10^5 M^{-1})$	<i>n</i>	$K_A (10^5 M^{-1})$
bPRPs	(1,2)	27,0±0,2	6,547±2,221	27,2±0,5	18,904±9,592	6,7±0,2	KA 6228,1±888,9
							KB 10,8±4,1
	(2,2)	11,7±0,08	0,00347±0,00003	55,8±2,9	0,5227±0,0703	42,6±0,1	KA 388,6±30,8
							KB 1,685±0,136
aPRPs	(1,2)	-	-	28,8±3,1	5,875±0,674	12,6±0,6	KA 919,7±4,9
							KB 918,9±4,9
	(2,2)	-	-	57,6±0,4	0,824±0,024	50,1±28,5	KA 2,65±0,32
							KB 0,0910±0,0089

B. pH 3,5-4,0							
PS	Set	(-)-epicatequina		malvidina-3-O-glucósido		EC + Mv-3-O-glc	
		<i>n</i>	$K_A (10^5 M^{-1})$	<i>n</i>	$K_A (10^5 M^{-1})$	<i>n</i>	$K_A (10^5 M^{-1})$
bPRPs	(1,2)	-	-	6,2±0,2	1,488±0,116	29,0±1,6	KA 0,0130±0,001
							KB 0,0146±0,001
	(2,2)	-	-	34,9±14,7	0,2015±0,0254	48,7±0,5	KA 221,6±99,9
							KB 0,166±0,0694
aPRPs	(1,1)	-	-	53,4±24,0	0,743±0,011	52,4±6,5	KA 13,03±0,31
							KB 0,01620±0,00006

Por comparação das K_A , verifica-se que para a generalidade das interações os valores de K_A do primeiro *set* de ligação (1,2) são superiores aos do segundo *set* (2,2). Isto parece ser coerente visto que será de esperar que a interação seja mais forte para os primeiros locais da proteína com os quais os polifenóis interagem do que os segundos,

sendo que estes últimos poderão corresponder aos pontos de estabilização dos complexos. Apesar de a amplitude das constantes obtidas ser muito alargada (de $0,003$ a $6228 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$), é possível inferir que o pH é um parâmetro importante na formação das interações, uma vez que valores baixos (pH 1,0) registam valores de K_A superiores, promovendo a sua afinidade.

Por outro lado, independentemente do pH, parece haver um efeito promotor da copigmentação na formação das interações polifenol-PS, uma vez que os valores de K_A aumentam quando a mistura tanino-antocianina está presente em comparação com a situação em que apenas um dos compostos polifenólicos está presente. Não obstante, é importante ainda referir uma interação em particular que parece ser exceção às observações referidas anteriormente, mais especificamente as interações estabelecidas entre as bPRPs a pH 3,5-4,0. Verifica-se que neste caso os valores de K_A parecem ser maiores não só no primeiro *set* de locais de ligação ($0,0130 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ em comparação com $0,0146 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ no segundo), mas também quando apenas a malvidina-3-O-glucósido se encontra a interagir com as PS ($1,448 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$). Assim, e apesar de os valores referidos não divergirem muito entre si, estas desigualdades observadas podem dever-se ao facto de estas interações (a pH mais elevados) não serem as mais fortes.

As diferenças entre as interações em que apenas os polifenóis estão presentes e quando a mistura tanino-antocianina se encontra em solução parecem ser mais evidentes nas condições a pH 1,0, talvez pelo facto de nestas condições as interações apresentarem uma maior afinidade, como já referido. O facto de os maiores valores de K_A registados serem referentes às interações que envolvem a mistura corrobora o que foi observado nos ensaios de STD-NMR, onde se verificou um aumento da afinidade de interação de ambas as PS quando o ligando em questão seria o complexo tanino-antocianina, por oposição aos dois polifenóis em separado.

Comparando as duas PS, as bPRPs apresentam de um modo geral valores de K_A superiores, parecendo ser as que possuem uma maior afinidade de interação. Esta observação, em particular a pH 1,0, parece contrariar os resultados obtidos nos ensaios de STD-NMR anteriormente descritos, uma vez que estas análises defendem uma maior afinidade relativamente às aPRPs. No entanto, é importante referir que neste último caso não se verificaram grandes diferenças entre os K_A obtidos, além de que estes valores apresentam um menor rigor comparativamente com as constantes obtidas por ITC. As concentrações das espécies abordadas também foram diferentes para cada técnica, tendo-se atingido rácios consideravelmente mais altos no caso do STD-NMR.

Relativamente aos valores de n obtidos, parece haver um aumento da quantidade de pontos de interação no segundo *set* relativamente ao primeiro, o que poderá estar

relacionado com as interações secundárias mais fracas estabelecidas entre o polifenol e a proteína que se formam de modo a estabilizar as interações principais. Estas interações secundárias podem então corresponder às pontes de hidrogénio que estão mais relacionadas com a estabilização dos complexos, como já descrito na literatura.^{86, 87} Ainda, a rácios [L]/[P] mais elevados, como acontece no caso do segundo *set*, o ligando/polifenol apresenta uma maior capacidade de atuar como uma molécula multidentada. Isto poderá justificar este aumento do valor de n com os rácios referidos, pois o composto polifenólico em questão irá ocupar os locais de ligação nas moléculas de PS numa maior extensão. Curiosamente, por comparação das interações de cada PS com os mesmos ligandos, verifica-se que as bPRPs parecem ter associados valores de n inferiores aos das aPRPs. Por exemplo, no caso da mistura (tanino+antocianina) a pH 1,0, as interações estabelecidas com as bPRPs apresentam valores de n de 6,7 e 42,6, enquanto as interações entre as aPRPs e os mesmos ligandos revelaram valores de 12,6 e 50,1. É importante referir que as aPRPs apresentam uma massa cerca de três vezes maior do que as bPRPs (14643 Da e 5388 Da, respetivamente), e, portanto, a capacidade para disponibilizar um maior número de locais de ligação poderá estar relacionada com o seu maior tamanho e não diretamente com a sua maior ou menor afinidade de interação.

A pH 3,5-4,0, as bPRPs encontram-se carregadas positivamente devido ao seu elevado *pI*, no entanto, as aPRPs possuem um *pI* próximo destes valores de pH, apresentando-se na forma zwitteriónica (neutra).¹⁵⁹ Deste modo, compreende-se que a acidez do meio tenha mais influência na sua capacidade de interação do que quando comparando com as bPRPs, o que pode justificar o facto de a valores de pH mais elevados as interações reveladas por ITC apenas apresentem um *set* de locais de ligação. De um modo geral, verifica-se uma alteração do valor de n quando ambos os polifenóis estão presentes por comparação com a situação em que apenas a malvidina-3-O-glucósido está a interagir e esta relação parece depender também do pH do meio. Mais concretamente, a pH 1,0, os valores de n diminuem quando a mistura está presente comparativamente com a situação em que a malvidina-3-O-glucósido está sozinha. Por outro lado, a pH 3,5-4,0 verifica-se um aumento dos valores de n por comparação dos dois tipos de ligando (apenas antocianina e tanino+antocianina). Uma vez mais, salienta-se que a capacidade de interação poderá não estar diretamente relacionada com o número de locais de ligação na proteína passíveis de estabelecer interações.

Os resultados obtidos por ITC permitiram também obter os parâmetros termodinâmicos para cada interação, os quais se encontram resumidos na **Tabela 6**.

Tabela 6. Parâmetros termodinâmicos (ΔH , ΔG e $-T \Delta S$) para as interações da (-)-epicatequina, malvidina-3-O-glucósido e a mistura 1:1 destes dois polifenóis (EC+Mv-3-O-glc) com as duas PS estudadas (bPRPs e aPRPs) a pH 3,5-4,0.

	PS	(-)-epicatequina			malvidina-3-O-glucósido			EC + Mv-3-O-glc		
		ΔH (kcal.mol ⁻¹)	ΔG (kcal.mol ⁻¹)	$-T \Delta S$ (kcal.mol ⁻¹)	ΔH (kcal.mol ⁻¹)	ΔG (kcal.mol ⁻¹)	$-T \Delta S$ (kcal.mol ⁻¹)	ΔH (kcal.mol ⁻¹)	ΔG (kcal.mol ⁻¹)	$-T \Delta S$ (kcal.mol ⁻¹)
pH 1,0	bPRPs	-2,3869	-7,934	-5,547	-0,030099	-8,562	-8,532	-66,916	-11,997	54,919
								-66,578	-8,231	58,347
		-99,846	-3,465	96,381	-0,57701	-6,437	-5,859	-42,585	-10,353	32,232
	aPRPs							-41,811	-7,13	34,681
		-	-	-	-0,15611	-7,87	-7,714	-51,651	-10,864	40,787
								51,456	-10,863	-62,319
pH 3,5- 4,0	bPRPs							-1,2934	-7,398	-6,105
					-0,75024	-6,706	-5,956	-0,061368	-5,401	-5,339
		-	-	-	-0,23623	-7,056	-6,82	20,684	-4,248	-24,932
	aPRPs							-21,347	-4,317	17,03
		-	-	-	-0,3708	-5,872	-5,5	-26,547	-10,021	16,526
								-26,495	-5,757	20,738

Verifica-se que os valores correspondentes à energia livre de Gibbs global (ΔG) são negativos para todas as interações, requisito este necessário numa interação biológica espontânea. Para além destes valores, os parâmetros de entalpia (ΔH) e entropia ($-T \Delta S$) são também relevantes na medida em que fornecem importantes informações acerca do tipo de ligações envolvidas nas interações estudadas. Em particular, o primeiro indica alterações de energia associadas a interações específicas não-covalentes, como as pontes de hidrogénio, enquanto o segundo está relacionado com as interações hidrofóbicas e alterações conformacionais. Concretizando, alterações ao nível da entropia estão muitas vezes associadas a um rearranjo da estrutura das moléculas de água do polifenol, como resultado das interações hidrofóbicas com resíduos apolares das PS. Por outro lado, numa situação em que os valores de ΔH são pouco negativos/positivos, aproximando-se significativamente de zero, pode ser considerada a interferência de um outro tipo de interações: as interações eletrostáticas.¹⁶⁰ Analisando os resultados da **Tabela 6**, verifica-se que esta última situação se observa para a generalidade das interações entre as duas PS e a malvidina-3-O-glucósido (desde -0,03 a -0,97 kcal.mol⁻¹). Na condição em que o pH é mais baixo (1,0) e que a antocianina se apresenta principalmente na forma de ião flavílio (carregada positivamente), este efeito

eletrostático parece ser mais evidente (valores de ΔH mais próximos de zero). Porém, o valor de ΔH que se afasta mais de zero corresponde à interação das aPRPs a pH mais elevado ($-0,97 \text{ kcal.mol}^{-1}$), onde estas PS se apresentam praticamente neutras, sendo de esperar que as interações eletrostáticas não sejam tão significativas nesta situação. Contrastando, esta tendência geral altera-se quando a (-)-epicatequina está presente e interage ao mesmo tempo com as PS, revelando interações favorecidas por entropia (valores de ΔH positivos e de $-T\Delta S$ negativos) e entalpia (valores de ΔH negativos e de $-T\Delta S$ positivos). Assim, estes resultados sugerem que o efeito de copigmentação promove o estabelecimento de interações hidrofóbicas e pontes de hidrogénio em alternativa às interações eletrostáticas. Ainda, observam-se algumas diferenças nas principais forças intervenientes em cada interação com a mistura, sendo que os valores de entalpia são mais negativos no caso das interações com as bPRPs em comparação com as aPRPs. Esta ideia formulada com base nos valores termodinâmicos obtidos parece apoiar a hipótese que as pontes de hidrogénio são as principais forças a atuar nas interações das bPRPs, enquanto as interações hidrofóbicas parecem contribuir mais para os complexos com aPRPs, ou então uma mistura de ambos os tipos de interações. Relativamente às interações estabelecidas entre a (-)-epicatequina e as bPRPs, verifica-se uma situação idêntica em que ambas as componentes entálpica e entrópica parecem interferir, ainda que com maior relevância para a primeira. No entanto, uma vez que a técnica abordada não permitiu obter grandes informações acerca das interações que este composto polifenólico estabelece com as aPRPs, ou mesmo a outras condições de pH, não é possível deduzir nenhuma conclusão ou comparar com os resultados referentes à mistura tanino-antocianina.

Dada a complexidade do sistema, a interpretação e discussão das características termodinâmicas são pouco detalhadas e restritas às interações que foram possíveis estudar. Deste modo, os resultados aqui apresentados e as conclusões sugeridas requerem estudos adicionais capazes de confirmar as relações estabelecidas para as diferentes interações, como por exemplo simulações de dinâmica molecular. Os sistemas abordados são consideravelmente complexos e providenciam algumas dificuldades na compreensão das informações obtidas, sendo que as técnicas utilizadas apresentem também algumas limitações. Esta carência de informação pode dever-se principalmente à falta de dados relativos à interação com a (-)-epicatequina. No entanto, os resultados obtidos fornecem já alguma ideia da complexidade e importância dos complexos tanino-antocianina na interação com diferentes PS. Estes são estudos muito preliminares e sem grandes precedentes e parecem revelar alguma pertinência no sentido de perceber a

influência do parâmetro de copigmentação entre taninos e antocianinas no desenvolvimento da adstringência em particular.

3. Estudos de sabor amargo

Os estudos da ativação de diferentes recetores do sabor amargo (TAS2Rs) por diferentes compostos polifenólicos tiveram por base dois objetivos distintos. Num deles, pretendia-se avaliar a ativação de TAS2Rs por 16 polifenóis selecionados previamente e descritos como amargos ao nível sensorial.¹³³ Para tal, foi feito o *screening* da ativação dos 25 TAS2Rs para cada um dos 16 compostos, de modo a compreender quais os recetores ativados e em que concentrações. Seguidamente, para os compostos que revelaram uma ativação específica de um ou mais TAS2Rs, foram traçadas as respetivas curvas dose-resposta, tendo sido testadas várias concentrações dos compostos para se estabelecerem curvas representativas da ativação dos recetores.

No segundo estudo referido, pretendia-se compreender qual a influência das PS na ativação dos TAS2Rs pelos polifenóis. Neste sentido, foram utilizados 4 compostos polifenólicos [(-)-epicatequina, malvidina-3-O-glucósido, procianidina trímero C2 e PGG], cuja ativação de diferentes recetores e as respetivas curvas dose-resposta se encontravam já estabelecidas.¹³ O efeito das PS na ativação dos TAS2Rs foi alcançada pela adição de uma mistura de PS representativa da saliva humana aos diferentes polifenóis de interesse. Todas as experiências foram realizadas tendo por base a medição dos níveis de Ca^{2+} intracelular.

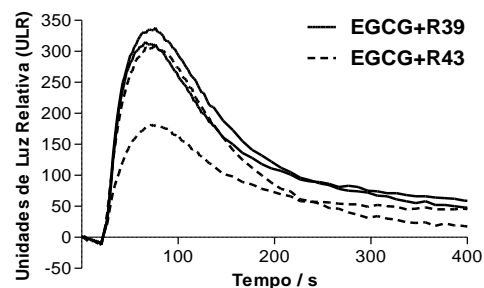
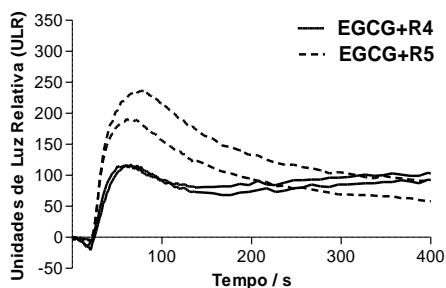
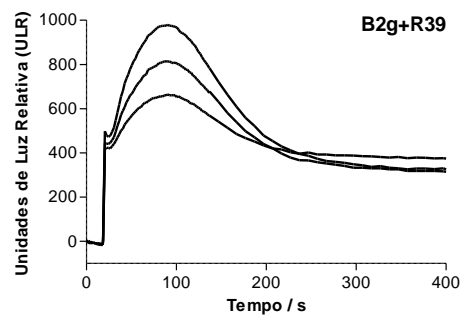
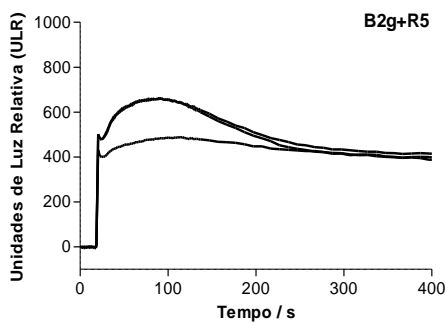
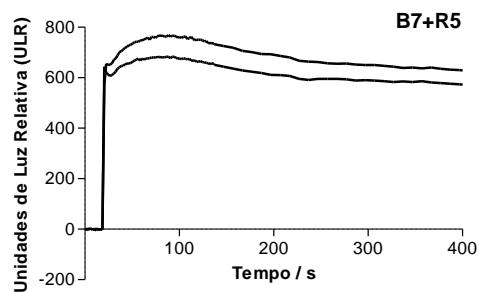
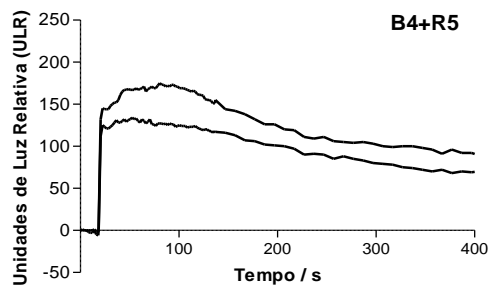
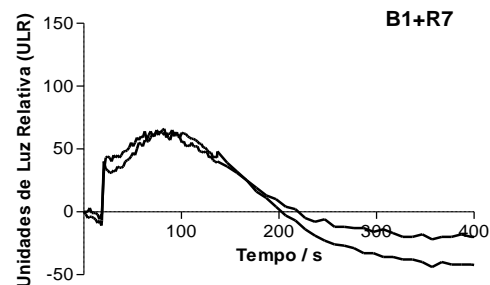
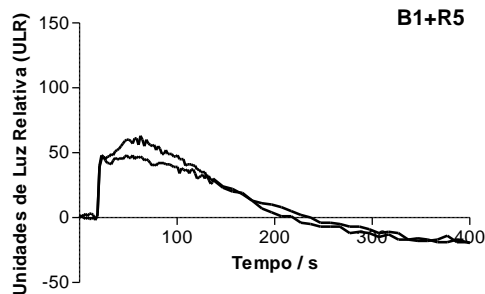
A deteção por uma sonda fluorescente do aumento do nível de Ca^{2+} intracelular tem vindo a ser utilizada nos estudos da ativação dos recetores do sabor amargo como resposta a agonistas, como alguns polifenóis. Apesar de este método ser apenas uma aproximação *in vitro* e muitas vezes não corroborar os dados sensoriais obtidos por experiências *in vivo*, as propriedades dos TAS2Rs abordados aproximam-se bastante dos resultados obtidos nos estudos psicofísicos com humanos.¹⁶¹

3.1. *Screening* de diferentes compostos polifenólicos

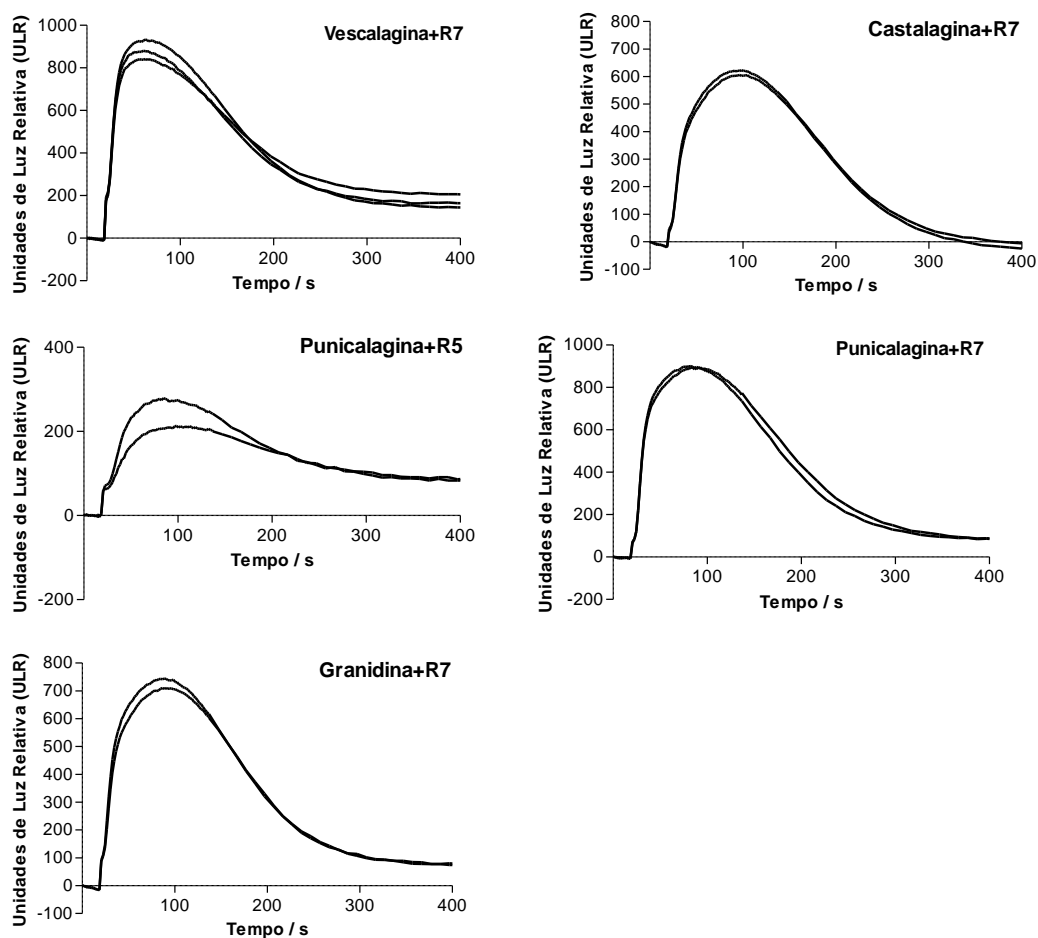
Foram selecionados 16 compostos polifenólicos descritos na bibliografia¹³³ como amargos através de ensaios sensoriais, de modo a identificar os TAS2Rs ativados e quais as concentrações necessárias para se observar um sinal significativo. Assim, foram testados 9 taninos condensados [procianidinas diméricas B1, B2, B3, B4, B6, B7, procianidina trimérica C1, B2g e EGCG], 4 taninos hidrolisáveis (vescalagina, castalagina, punicalagina e grandinina) e 3 ésteres etílicos (ácido ferúlico, ácido protocatechuico e ácido vanílico). Para além da variedade de classes polifenólicas abordadas, estes

compostos apresentam também uma grande diversidade estrutural e diferentes massas moleculares.

TANINOS CONDENSADOS



TANINOS HIDROLISÁVEIS



ÉSTERES ETÍICOS

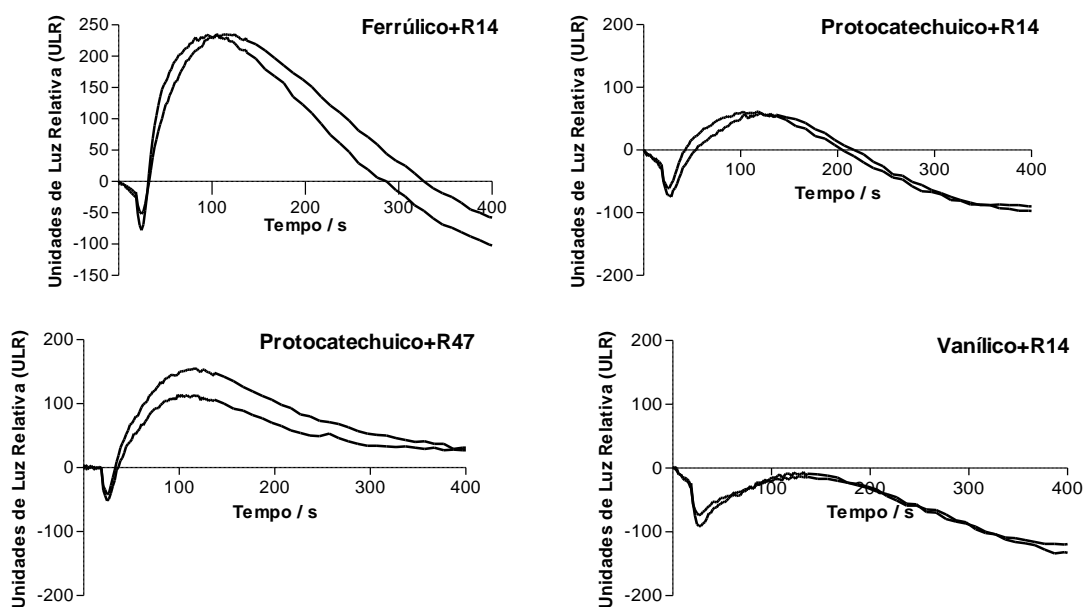


Figura 35. Ativação dos TAS2Rs pelos diferentes compostos polifenólicos, representada pela alteração da fluorescência de células HEK293T marcadas com Fluo4-AM e transfetadas com os TAS2Rs representados nos gráficos. Todos os ensaios foram realizados em triplicado, apesar de alguns casos apenas mostrarem duplicados.

Os ensaios de *screening* realizados para cada um dos 16 referidos compostos foram realizados em triplicado para células transfetadas com os 25 TAS2Rs (R1, R3, R4, R5, R7, R8, R9, R10, R13, R14, R16, R38, R39, R40, R41, R42, R43, R44, R45, R47, R48, R49, R50 e R60) e dois vetores controlo (*mock*) sem o DNA dos recetores (pB28 e pEAK10). As concentrações utilizadas, na gama de μM , foram otimizadas para cada composto, de modo a não se produzir sinais não-específicos (artefactos), mas para se observar uma ativação evidente dos recetores. Como resultado deste *screening*, observou-se a ativação de um ou mais recetores para quase todos os compostos analisados, com exceção das procianidinas B2, B3, B6 e C1, cujos sinais não foram conclusivos de nenhuma ativação nas condições/concentrações estudadas. Em suma, foi observada a ativação de 7 TAS2Rs diferentes por 12 dos 16 compostos polifenólicos analisados. Os sinais observados representativos das ativações dos recetores estão exemplificados na **Figura 35** e os TAS2Rs ativados estão sumarizados na **Tabela 7**.

Tabela 7. Tabela resumo das ativações dos 8 TAS2Rs resultantes da adição de 12 diferentes compostos fenólicos. O sinal “+” corresponde à observação de uma resposta, o que corresponde à ativação de um recetor. Os restantes TAS2Rs não são referidos, uma vez que não se verificou nenhum sinal representativo de uma ativação.

Composto		TAS2R						
		R4	R5	R7	R14	R39	R43	R47
Taninos Condensados	B1	-	+	+	-	-	-	-
	B2	-	-	-	-	-	-	-
	B3	-	-	-	-	-	-	-
	B4	-	+	-	-	-	-	-
	B6	-	-	-	-	-	-	-
	B7	-	+	-	-	-	-	-
	C1	-	-	-	-	-	-	-
	B2g	-	+	-	-	+	-	-
	EGCG	+	+	-	-	+	+	-
Taninos Hidrolisáveis	Vescalagina	-	-	+	-	-	-	-
	Castalagina	-	-	+	-	-	-	-
	Punicalagina	-	+	+	-	-	-	-
	Grandinina	-	-	+	-	-	-	-
Ésteres Eftílicos	Ferúlico	-	-	-	+	-	-	-
	Protocatechuico	-	-	-	+	-	-	+
	Vanílico	-	-	-	+	-	-	-

É possível observar uma ativação dos diferentes recetores pelos gráficos representados, uma vez que foi detetado um sinal fluorescente resultante da libertação de Ca^{2+} , traduzindo-se num afastamento da linha de base em relação ao eixo dos xx. Curiosamente, verifica-se que para uma mesma classe de compostos polifenólicos,

parece haver uma certa especificidade na ativação de um dado recetor. Mais concretamente, todos os taninos condensados (**Figura 36**) ativaram em específico o TSA2R5, tal como já tinha sido verificado relativamente a outros taninos desta classe, mais concretamente a (-)-epicatequina e a procianidina trimérica C2.¹³ Além disto, os taninos condensados aqui analisados (B1, B2g e EGCG) ativaram ainda mais alguns recetores diferentes. A procianidina B1 ativou o TAS2R7, enquanto que a B2g e a EGCG ativaram o TAS2R39. Ainda, a EGCG foi o composto polifenólico que ativou um maior número de recetores, num total de 4 (TAS2R4, 5, 39 e 43). Relativamente aos taninos hidrolisáveis (**Figura 37**), observa-se uma ativação do TAS2R7 em todos os casos, sendo que para a punicalagina verificou-se uma ativação adicional do TAS2R5. Por fim, esta tendência também se aplicou aos ésteres etílicos (**Figura 38**), na medida em que todos ativaram o TAS2R14 e ainda o TAS2R47, no caso do ácido protocatechuico.

Apesar de parecer haver a preferência de uma determinada classe de polifenóis para um recetor específico, não se consegue estabelecer uma interação exclusiva, a não ser no caso dos ésteres etílicos. Na verdade, estes compostos foram os únicos, entre os estudados, capazes de ativar o TAS2R14, indicando que a sua estrutura específica (COOCH₂CH₃, **Figura 38**) poderá ser essencial na interação com o recetor. Ainda, a ativação do TAS2R39 por apenas dois taninos (B2g e EGCG) poderá sugerir que algo na sua estrutura (**Figura 36**) que os distingue dos restantes taninos condensados seja requerida na ativação específica deste recetor. Comparando as estruturas dos compostos, observa-se que tanto a B2g como a EGCG possuem um grupo adicional (galhoilo) que é característico de uma outra classe de taninos, os galhotaninos. Curiosamente, foi já reportada a ativação deste recetor pela PGG (galhotanino, **Figura 37**),¹³ sendo que um outro estudo relaciona esta maior capacidade de ativação do TAS2R39 com a presença, por um lado, dos três grupos hidroxilo (existentes no grupo galhoilo) e, por outro, do resíduo de glucose.¹⁶² No entanto, e apesar da PGG parecer confirmar esta relação em ambos os aspetos, a B2g e a EGCG não possuem nenhum resíduo de glucose na sua estrutura. Ainda, a ativação do TAS2R39 não será exclusiva destes fatores, visto que a (-)-epicatequina é também capaz de induzir um sinal fluorescente.

A ideia de que os grupos catecol e/ou galhoilo são requeridos para a ativação do TASR5¹³ é confirmada pelo facto de todos os polifenóis abordados que induziram uma resposta por este recetor possuírem pelo menos dois dos grupos referidos. Contudo, novamente, a presença destes grupos não será suficiente para promover uma resposta pelo recetor, visto que outros taninos aqui estudados (condensados e hidrolisáveis) não foram capazes de induzir um aumento da fluorescência associado à libertação de Ca²⁺.

A relação observada entre a ativação de um recetor em específico por uma mesma classe de polifenóis poderá estar, então, relacionada com as semelhanças estruturais associadas a cada classe, apoiando a ideia que a ativação dos diferentes TAS2Rs dependerá da estrutura da molécula que estabelece ligação. Assim, para além de se comprovar que um mesmo composto polifenólico é capaz de ativar mais do que um recetor, verifica-se também que um recetor poderá ser ativado por diferentes compostos não necessariamente da mesma classe, confirmando-se o padrão de ativação combinatorial associado a estes recetores já descrito na literatura.^{13, 129, 144} Estas observações são realmente interessantes na medida em que reforçam a ideia que indivíduos com diferentes expressões de TAS2Rs percecionem o amargor dos alimentos de forma diferente.

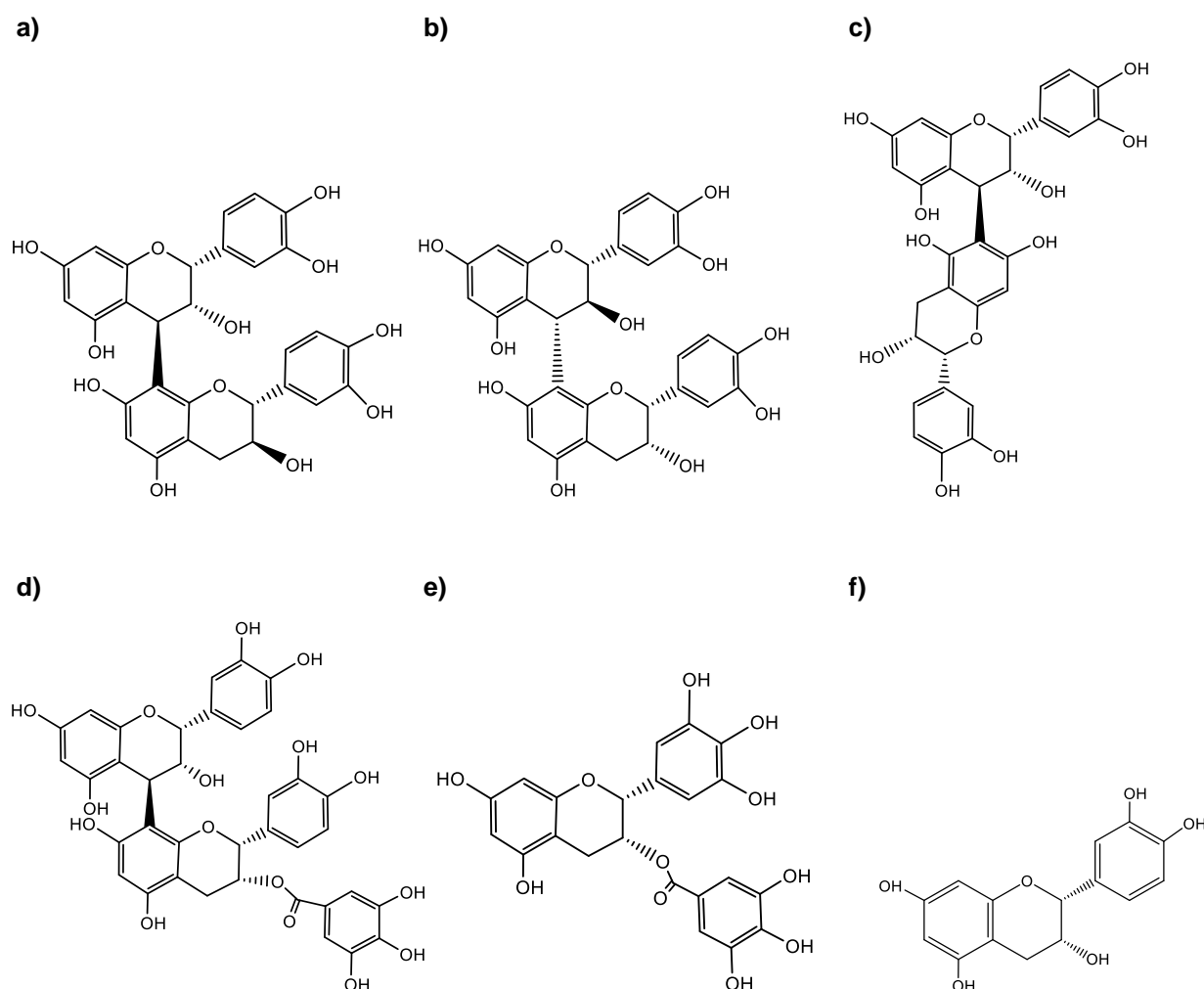


Figura 36. Estruturas químicas dos taninos condensados: **a)** dímero B1, **b)** dímero B4, **c)** dímero B7, **d)** B2g, **e)** EGCG e **f)** (-)-epicatequina.

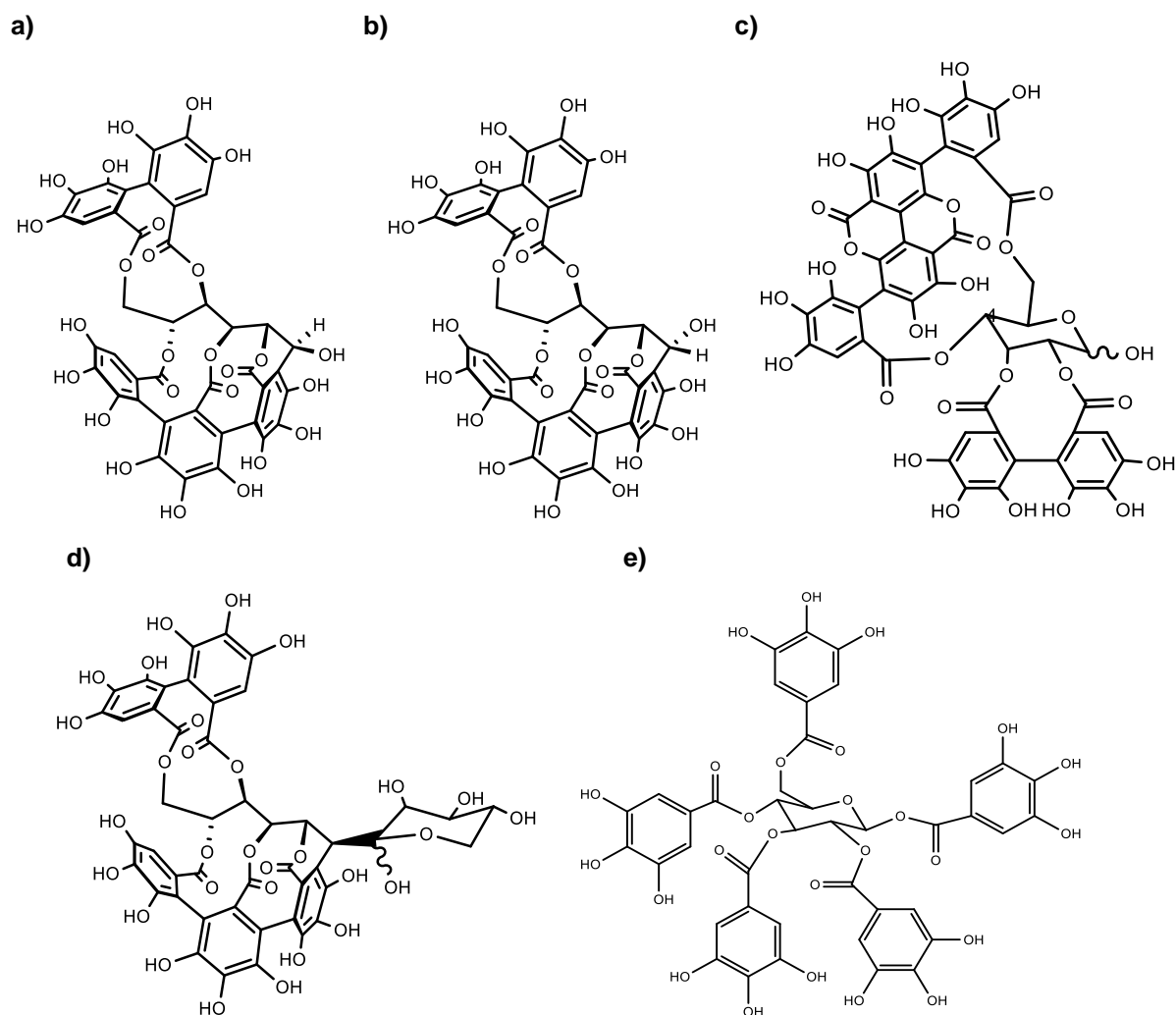


Figura 37. Estruturas químicas dos taninos hidrolisáveis: **a)** vescalagina, **b)** castalagina, **c)** punicalagina, **d)** grandinina e **e)** PGG.

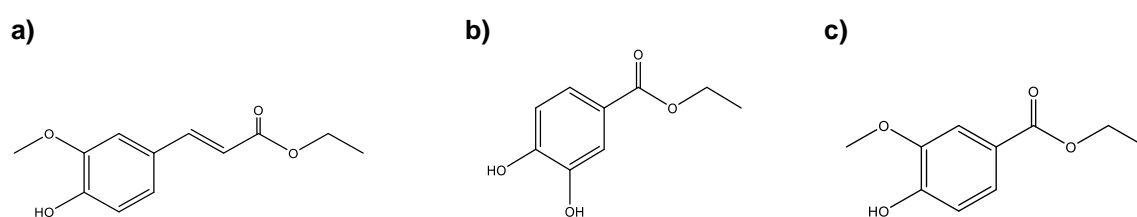


Figura 38. Estruturas químicas dos ésteres etílicos: **a)** ácido ferúlico, **b)** ácido protocatechuico e **c)** ácido vanílico.

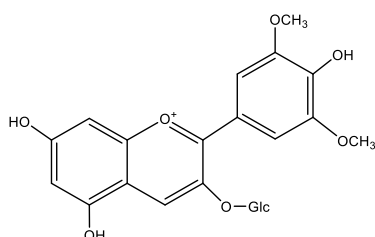
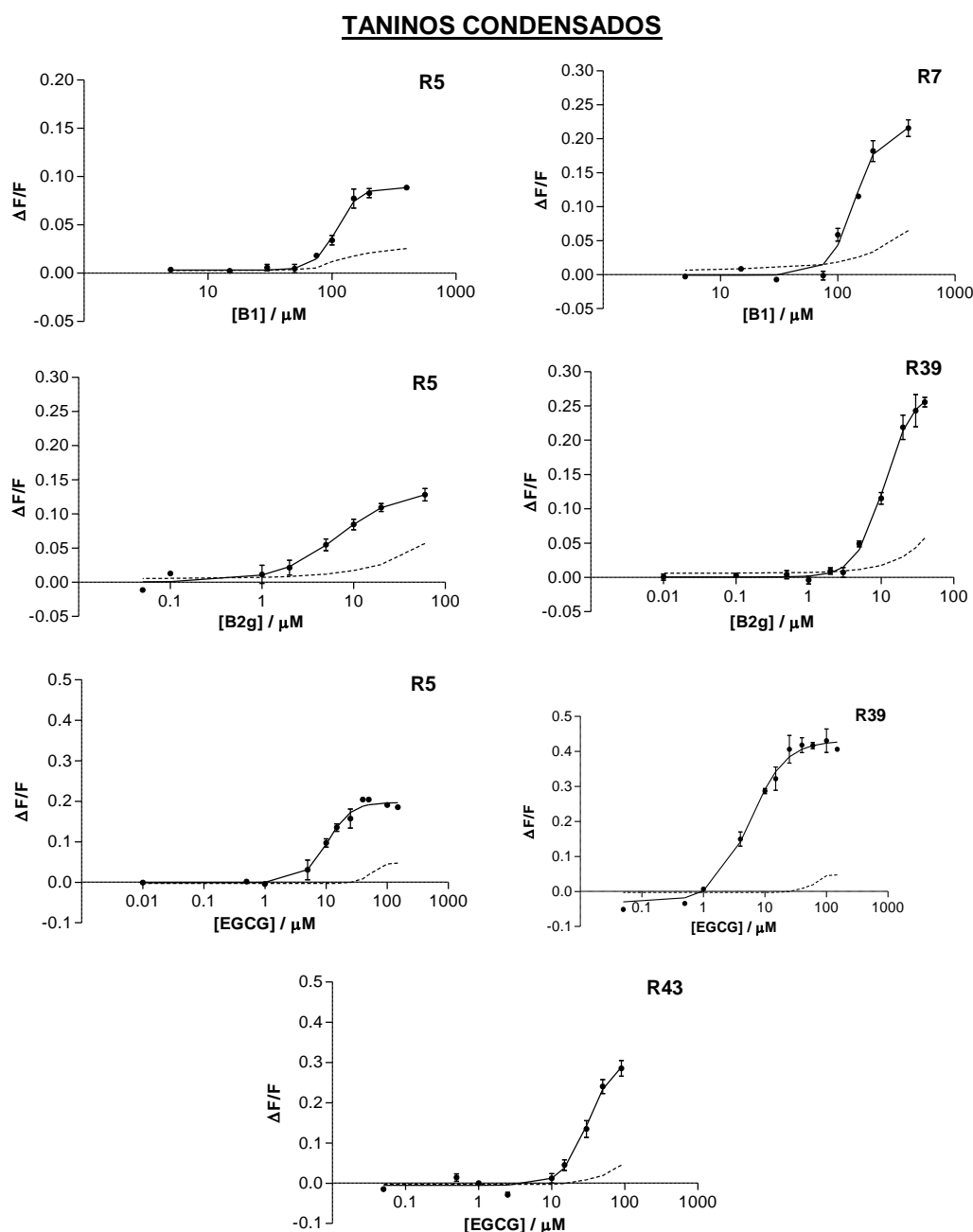


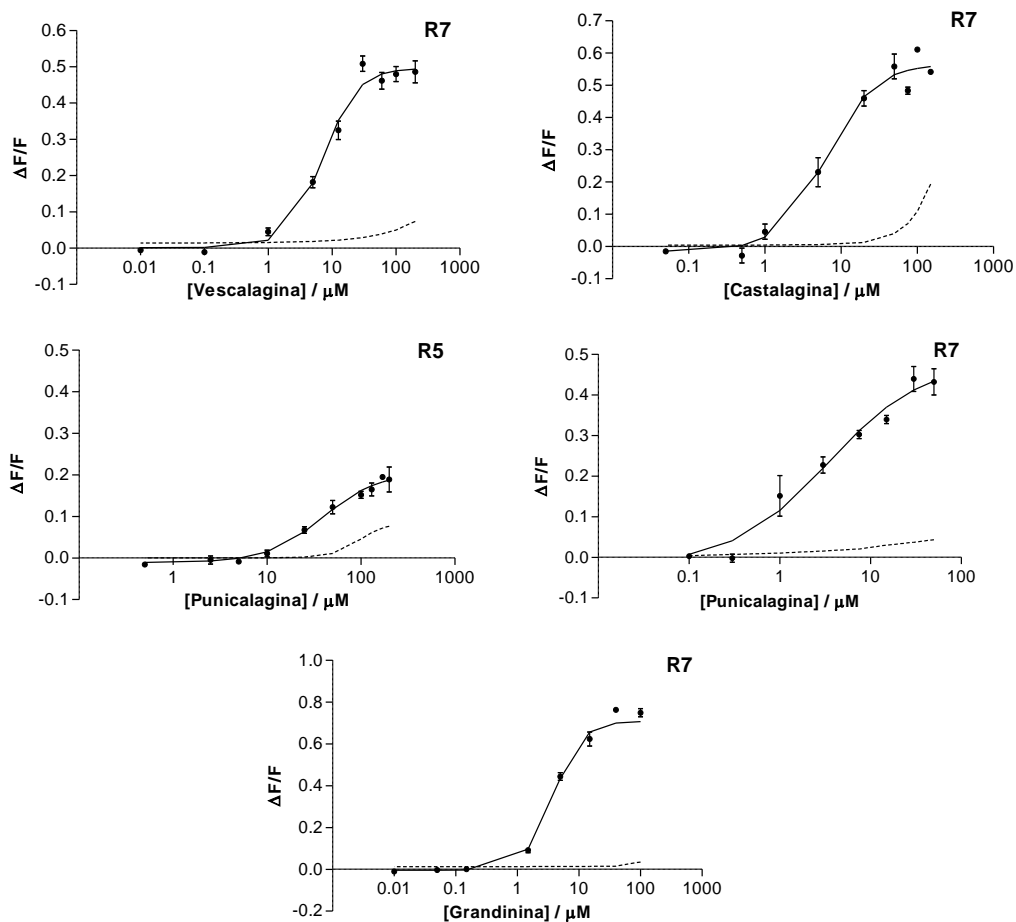
Figura 39. Estrutura química da antocianina malvidina-3-O-glucósido. A abreviação “Glc” refere-se à substituição do grupo na posição 3 do anel C por uma unidade de glucose.

3.2. Curvas dose-resposta

Após identificar os compostos polifenólicos capazes de ativar os diferentes TAS2Rs, produzindo um sinal de fluorescência significativo e sem interferências de artefactos, foram testadas diferentes concentrações dos referidos compostos de modo a traçar uma curva dose-resposta representativa de cada ativação registada na **Tabela 7**. Porém, isto não foi exequível para todas as ativações detetadas nos ensaios de *screening*, uma vez que em algumas situações a ativação é demasiado fraca. Assim, as ativações que permitiram definir curvas dose-resposta estão representadas na **Figura 40**.



TANINOS HIDROLISÁVEIS



ÉSTERES ETÍLICOS

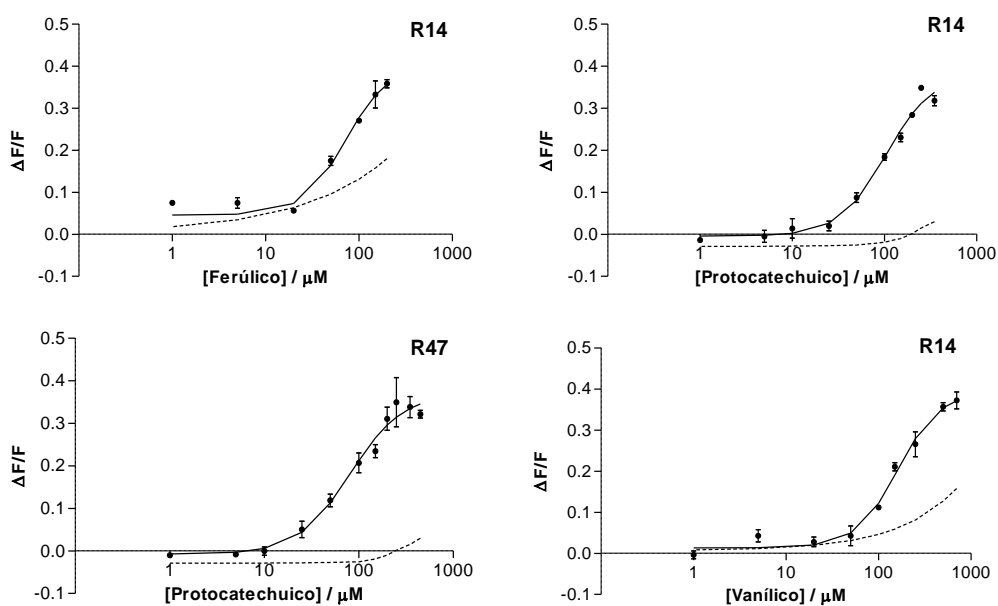


Figura 40. Curvas dose-resposta para as células HEK293T transfetadas com os diferentes TAS2Rs que apresentaram ativação quando estimulados pelos diferentes compostos fenólicos indicados. A amplitude dos sinais é dada pelas alterações relativas de fluorescência, sendo representada por $\Delta F/F$. Os pontos representam os valores experimentais obtidos em triplicado para cada concentração (escala logarítmica) de polifenol testada, com os respetivos erros padrão associados. A linha a cheio corresponde ao melhor *fitting* traçado para os valores experimentais, enquanto que a linha a tracejado representa os valores experimentais de *mock* observados.

No caso da ativação do recetor TAS2R5 pelas procianidinas diméricas B4 e B7 e do TAS2R4 pela EGCG, não foi possível estabelecer uma curva dose-resposta com um *plateau* de saturação bem definido utilizando concentrações de compostos às quais não estivessem associadas respostas não-específicas (dados não apresentados). As restantes ativações dos TAS2Rs permitiram traçar curvas dose-resposta com dois patamares de estabilização e com a típica forma sigmoidal, como representado. A partir destas curvas dose-resposta é também possível determinar os respetivos valores de EC_{50} , os quais se encontram sumarizados na **Tabela 8**.

Tabela 8. Valores de EC_{50} para os 10 compostos polifenólicos que mostraram um efeito ativador de alguns TAS2Rs e cujas curvas dose-resposta apresentaram um perfil bem definido. Os valores com diferentes letras são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Composto		$EC_{50} / \mu M$					
		TAS2R5	TAS2R7	TAS2R14	TAS2R39	TAS2R43	TAS2R47
Taninos Condensados	B1	119,34±10,71 ^a	123,95±17,27 ^a	-	-	-	-
	B2G	6,29±3,22 ^b	-	-	9,11±6,05 ^b	-	-
	EGCG	12,30±3,63 ^b	-	-	8,50±2,84 ^b	16,72±13,71 ^b	-
Taninos Hidrolisáveis	Vescalagina	-	7,26±1,57 ^b	-	-	-	-
	Castalagina	-	4,44±1,43 ^b	-	-	-	-
	Punicalagina	40,43±2,77 ^c	3,95±2,49 ^b	-	-	-	-
	Grandinina	-	2,43±1,29 ^b	-	-	-	-
Ésteres Etilícos	Ferúlico	-	-	66,65±4,36 ^{c,d}	-	-	-
	Protocatechuico	-	-	155,64±46,36 ^{a,e}	-	-	82,39±2,18 ^{a,d}
	Vanílico	-	-	151,17±7,81 ^{a,e}	-	-	-

De um modo geral, tendo em conta as diferentes curvas dose-resposta e respetivos valores de EC_{50} , os elagitaninos parecem ser, entre os compostos estudados, os ativadores mais eficientes na ativação dos recetores, pelo menos no caso particular do TAS2R7. Estes são os compostos polifenólicos que apresentam valores de EC_{50} mais baixos (de 2,43 a 7,26 μM) e revelam maiores amplitudes dos valores de fluorescência (0,76, no caso da grandinina). A diferença de ativação do mesmo recetor quando este interage com uma classe de taninos diferente (procianidina B1), onde o valor de EC_{50} pode ser até 50 vezes maior do que o calculado para os elagitaninos (123,95 μM), é curiosa.

Isto parece, então, sugerir, a maior especificidade destes taninos hidrolisáveis na ativação do TAS2R7 em particular, muito provavelmente pelas suas características estruturais. A ativação deste recetor foi também observada para outro polifenol que, tal como os elagitaninos, possui um resíduo de glucose, a malvidina-3-O-glucósido.¹³ Por oposição, os ésteres etílicos são os compostos com valores de EC_{50} mais elevados (66,65, 151,17 e 155,64 μ M), sendo necessária uma maior concentração destes polifenóis para se obter a mesma resposta de ativação dos TAS2Rs do que no caso dos taninos condensados e ainda mais do que nos elagitaninos. Assim, relacionando o cômputo geral e por comparação das diferenças estruturais dos compostos estudados, parece haver uma relação entre o aumento de tamanho e complexação dos polifenóis (elagitaninos) com a maior sensibilidade de ativação dos recetores do sabor amargo. Não existe uma relação clara na literatura entre as dimensões/estruturas das substâncias amargas e o seu amargor. No entanto, alguns estudos realizados com compostos polifenólicos presentes no vinho confirmam esta ideia, defendendo que estruturas maiores são percecionadas como mais amargas.¹³³ Porém, é importante mencionar que estas conclusões referem-se a TAS2Rs específicos para cada classe de polifenóis, e, por isso, as observações *in vivo* poderão não corroborar os resultados obtidos pelo facto de nem todos os TAS2Rs serem expressos de igual modo em todos os indivíduos.

Apesar de grande parte destes compostos serem encontrados em concentrações mais baixas nos alimentos e, em especial no vinho,¹³³ comparativamente com os valores de EC_{50} determinados, verifica-se que estes compostos são capazes de ativar alguns TSA2Rs. Porém, existem estudos¹⁶³ que reportam concentrações de elagitaninos encontradas no vinho próximas dos respetivos valores de EC_{50} aqui reportados, sugerindo que estes poderão ser importantes no desenvolvimento do amargor do vinho.

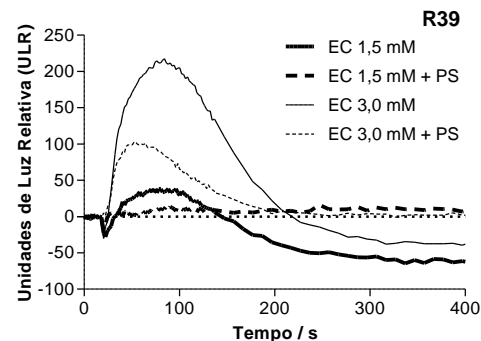
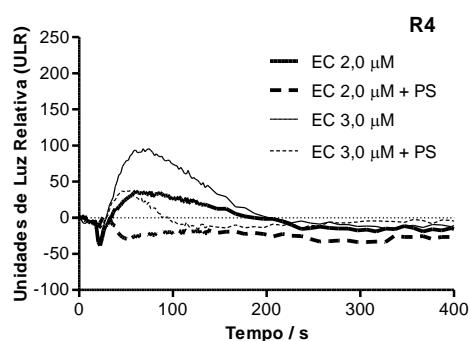
3.3. Interação polifenol-PS na ativação de TAS2Rs

Estudos anteriores^{13, 164} revelaram que certos compostos, apesar de não serem reportados como amargos em análises sensoriais,¹³³ são capazes de ativar diferentes TAS2Rs. Considerando o caso particular dos polifenóis, sabe-se que ocorre uma interação com as PS presentes na cavidade oral.⁶⁵ Deste modo, coloca-se em questão se esta interação poderá influenciar a perceção do sabor amargo no que diz respeito à ativação dos diferentes TAS2Rs.

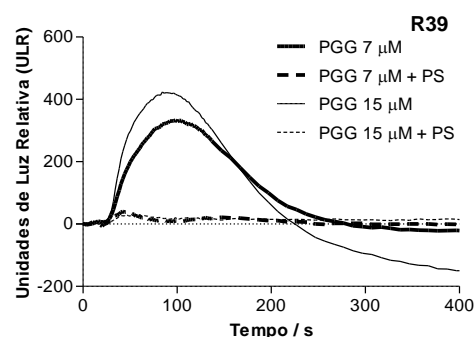
Neste estudo, foram selecionados 4 polifenóis representativos de três classes distintas (taninos condensados, hidrolisáveis e antocianinas): (-)-epicatequina, procianidina trimérica C2, PGG e malvidina-3-O-glucósido, respetivamente. A identificação destes compostos como agonistas de diferentes TAS2Rs foi realizada

previamente pelo grupo, assim como determinadas as respetivas curvas dose-resposta e valores de EC_{50} .¹³ Os recetores ativados pela (-)-epicatequina correspondem aos TAS2R4, 5 e 39, enquanto o trímero C2 apenas apresentou afinidade para o TAS2R5, à semelhança da PGG que, para além deste último, mostrou capacidade de ativação do TAS2R39. A malvidina-3-O-glucósido, por outro lado, foi a única capaz de ativar o TAS2R7. Tendo estes resultados em conta, o efeito da adição da mistura de PS na ativação dos referidos recetores pelos polifenóis foi estudada pelas alterações dos sinais de fluorescência. Não foi possível utilizar amostras de saliva sem nenhum tratamento de separação, uma vez que os sinais obtidos nos ensaios preliminares apresentavam artefactos que poderiam influenciar os resultados finais. Assim, foi utilizada uma mistura de PS com concentrações de cada família semelhantes às encontradas numa amostra de saliva humana: bPRPs a 35 μ M, gPRPs a 16 μ M, aPRPs a 30 μ M, estaterina a 12 μ M, péptido P-B a 12 μ M e cistatinas a 26 μ M. Após terem sido testadas várias diluições desta mistura de proteínas, verificou-se que o melhor compromisso entre sinal e artefacto correspondia a uma diluição de 40% e, por isso, os ensaios com polifenóis foram realizados num rácio saliva-polifenol 60:25. As concentrações de polifenol adicionada a cada interação foi estabelecida considerando as respetivas curvas dose-resposta,¹³ tendo o cuidado de garantir a ausência de artefactos em cada estudo. Assim, foram utilizadas duas concentrações diferentes de cada composto, sendo que no caso da (-)-epicatequina foram estudadas interações a 2,0 e 3,0 mM, o trímero C2 foi analisado a 40 e 90 μ M, a PGG a 7 e 15 μ M e, por fim, a malvidina-3-O-glucósido a 20 e 40 μ M. Os resultados da adição da mistura de PS a cada interação polifenol-TAS2R, para as diferentes concentrações de polifenol referidas, estão representados na **Figura 41**.

A.



B.



C.

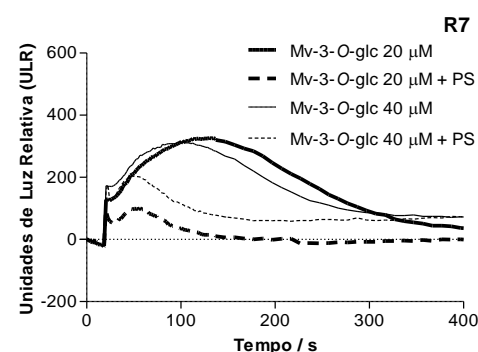


Figura 41. Ativação dos TAS2Rs pela **A** | (-)-epicatequina (EC), **B** | PGG e **C** | malvidina-3-O-glucósido (Mv-3-O-glc) separadamente (linhas a cheio) e quando em interação com a mistura de PS (linhas a tracejado), representada pela alteração da fluorescência de células HEK293T marcadas com Fluo4-AM e transfectadas com os TAS2Rs representados.

Verifica-se de um modo geral que a adição da mistura de PS resultou numa diminuição do sinal fluorescente detetado, relativamente ao sinal observado quando apenas o composto polifenólico estaria presente. Porém, não foi observado nenhum decréscimo no caso da procianidina trímero C2 (dados não apresentados). Este tanino condensado é, dos polifenóis abordados, o que apresenta uma menor capacidade de ativação do recetor, apresentando uma amplitude de sinal muito baixa.¹³ Assim, e apesar de o trímero C2 interagir consideravelmente com as PS,¹⁵² é compreensível que a adição destas não influencie muito a ativação do TAS2R5, que já por si só não é muito elevada. Ainda, curiosamente, verifica-se que esta falta de efeito das PS na diminuição da ativação do TAS2R5 não é exclusiva do trímero C2. Também no caso da (-)-epicatequina e da PGG, cuja ativação específica deste recetor foi já confirmada, não houve alteração do sinal de fluorescência ou, por vezes, verificou-se um aumento (dados não apresentados). Ocasionalmente, a transfeção das células HEK293T com determinados TAS2Rs pode alterar a sua sensibilidade de resposta a estímulos externos e também afetar a sua viabilidade. Esta hipótese poderá justificar a falta de coerência dos resultados obtidos com

as células transfetadas com o TAS2R5 perante a adição das PS. No entanto, é aconselhável realizar estudos complementares no futuro para poder confirmar esta teoria e tentar compreender o efeito real das PS na ativação particular do TAS2R5.

De modo a compreender em que medida é que a adição das PS influencia a ativação dos TAS2Rs, a redução do sinal fluorescente e, portanto, da ativação de cada recetor, foi calculada e encontra-se representada nos gráficos de barras da **Figura 42**. Esta redução foi determinada percentualmente e pela diferença entre as áreas dos sinais de ativação dos TAS2Rs (polifenol+TAS2R) e dos sinais da interação (polifenol+TAS2R+mistura PS).

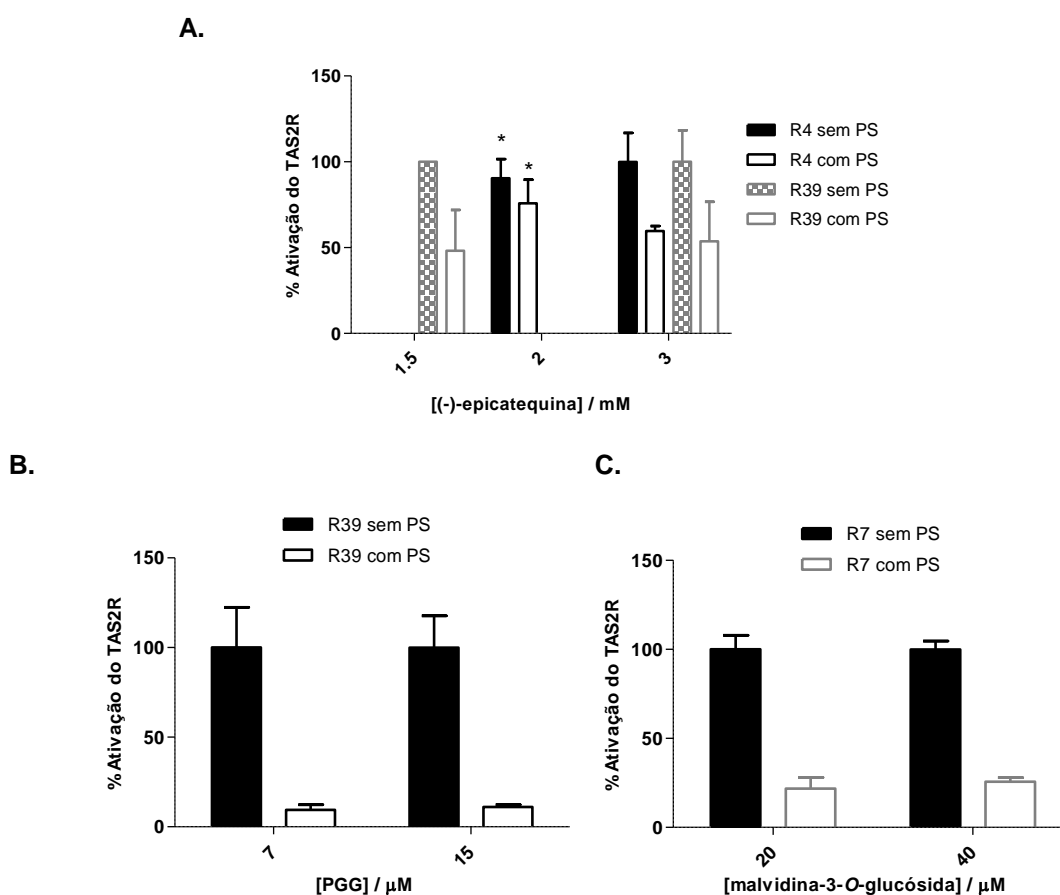


Figura 42. Representação gráfica da percentagem de ativação de cada TAS2R indicado como resultado da adição da mistura de PS, por comparação com os sinais de fluorescência desencadeados pelos polifenóis quando estes interagem somente com os TAS2Rs. **A** | (-)-epicatequina, **B** | PGG e **C** | malvidina-3-O-glucósido. Todos os gráficos são significativamente diferentes ($p < 0,05$), com exceção dos identificados com *.

Verifica-se que a redução da percentagem de ativação dos diferentes recetores é maior no caso da PGG, seguindo-se a malvidina-3-O-glucósido e por fim as interações envolvendo a (-)-epicatequina parecem ser as menos afetadas pela presença de PS. Estes resultados são de algum modo expectáveis, uma vez que as PS parecem

apresentar uma maior afinidade, neste caso, para o tanino elágico de alto peso molecular [PGG, **Figura 37.e**] e menor para o tanino condensado monomérico [(-)-epicatequina, **Figura 36.f**], apoiando a relação já bem estabelecida entre a maior interação das PS com polifenóis de grandes dimensões e com elevado grau de galhoilação.^{54, 78}

Por outro lado, o alto efeito redutor da ativação do TAS2R7 pelas PS no caso da malvidina-3-O-glucósido (**Figura 39**) foi de algum modo inesperado, visto que a interação antocianina-PS se encontra pouco descrita na literatura. No entanto, esta observação vai de encontro com os resultados obtidos em estudos recentes que demonstram a formação de complexos entre estas duas espécies.¹⁴ Isto parece também corroborar com os resultados obtidos nos ensaios de copigmentação descritos no capítulo anterior que confirmam a interação da malvidina-3-O-glucósido com algumas PS. Para além disso, esta relação parece justificar o facto de análises sensoriais não atribuírem um carácter amargo a este flavonóide, mas estudos *in vitro* revelarem um forte poder ativador do TAS2R7 nas concentrações em que geralmente o polifenol se encontra nos alimentos e em particular no vinho.¹³ Considerando o modelo de interação polifenol-PS, propõe-se assim que as PS impeçam o contacto destes compostos polifenólicos com os TAS2Rs e, por conseguinte, a sua ativação seja reduzida. Isto poderá, deste modo, implicar a diminuição da perceção do amargor *in vivo* comparativamente com o que teoricamente estes compostos desencadeiam.

No caso particular da (-)-epicatequina, onde a adição das PS reduziu a ativação dos recetores mas menos significativamente, não se verifica grande diferença entre os dois recetores, no entanto, a concentração do polifenol presente parece ser relevante na redução da ativação do TAS2R4. Aumentando a concentração do tanino (3,0 mM), constata-se que a redução do sinal com a presença de PS é superior do que a menores concentrações (2,0 mM). Este efeito da concentração não se registou, no entanto, nos casos da PGG e da malvidina-3-O-glucósido, muito provavelmente porque nestas condições já se terá atingido o rácio polifenol-PS de interação máxima e a redução do sinal observada é também consideravelmente maior.

Em suma, os resultados sugerem que a presença de PS poderá influenciar o desenvolvimento do sabor amargo quando os diferentes recetores estão envolvidos. Esta observação torna a compreensão da perceção do amargor pela ativação dos recetores algo complexa, uma vez que a este fenómeno parecem estar associadas diversas variantes. Para além da já referida variabilidade de expressão dos TAS2Rs por diferentes indivíduos, verifica-se também agora que cada um destes recetores não é afetado de igual modo pelas PS da cavidade oral. Para além disto, seria interessante perceber qual o efeito individual de cada uma das famílias de PS na ativação destes recetores.

Foram também realizados estudos preliminares no sentido de compreender o efeito da adição da mistura de PS ao complexo polifenol-recetor ao longo do tempo. Nesta análise, a PGG a 15 μ M foi utilizada como exemplo por ser o polifenol que apresentou uma maior sensibilidade quando exposto às PS na ativação do TAS2R39. Mais concretamente, a ativação deste recetor foi analisada a 0, 5, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos após a adição da mistura de PS. Os resultados, realizados em triplicados, não demonstraram uma diferença significativa da percentagem de ativação do TAS2R39 consoante o tempo (dados não apresentados). No entanto, estes ensaios poderiam ser alargados aos restantes polifenóis analisados de modo a confirmar a independência da ativação dos TAS2Rs com o aumento da exposição às PS.

V. Conclusão e perspectivas futuras

V. Conclusão e perspectivas futuras

O presente trabalho teve como objetivo abordar, por um lado, o mecanismo responsável pelo desenvolvimento da adstringência através do estudo das diferentes interações polifenóis-PS e, por outro lado, identificar diferentes polifenóis como agonistas de TAS2Rs, bem como definir o papel das PS na percepção do amargor.

A hipótese atualmente mais aceite para explicar o desenvolvimento da adstringência baseia-se nas interações entre os polifenóis dos alimentos e as PS da cavidade oral. Deste modo, foram utilizadas diferentes famílias de PS isoladas da saliva humana para estudar as interações estabelecidas com duas conhecidas classes de polifenóis, estando uma mais comumente associada à sensação de adstringência do que outra. Os estudos realizados com a primeira classe, referente aos taninos (hidrolisáveis e condensados), permitiu relacionar as suas diferenças estruturais com a maior ou menor afinidade de interação com PS pouco abundantes na saliva (estaterina, péptido P-B e cistatinas), mas não sendo por isso menos significativas no desenvolvimento da adstringência. Os resultados obtidos por extinção de fluorescência e STD-NMR permitiram comparar as diferentes constantes de afinidade e, assim, estabeleceu-se uma relação entre a estrutura das PS e a hidrofobicidade dos taninos na capacidade de interação. Mais concretamente, observou-se uma maior afinidade entre os elagitaninos no geral, em particular a punicalagina, e todas as PS, mas em especial o péptido P-B. Contrariamente, as cistatinas (PS mais estruturadas) revelaram uma menor capacidade de interação com os taninos estudados. No futuro, a técnica de ITC poderia ser aplicada aos modelos utilizados para confirmar o tipo de ligações mais associado a cada complexo tanino-PS. Seria também interessante progredir nos estudos relativos às procianidinas diméricas no sentido de compreender a importância da localização da ligação interflavânica na formação das interações com diferentes PS. Considerando a falta de corroboração com os estudos *in vivo*, poder-se-ia também realizar mais estudos semelhantes abordando outras PS e polifenóis, de modo a estabelecer uma relação com as propriedades sensoriais.

Por recurso à técnica STD-NMR, mas agora com a complementação de análises por ITC, foi possível estudar o efeito de uma classe de polifenóis diferente (antocianinas) nas interações com diferentes PS. Nesta situação, a abordagem foi um pouco distinta da anterior, pois o objetivo principal era compreender o papel do fenómeno de copigmentação na afinidade com as PS. Por conseguinte, as interações estabelecidas entre o complexo (-)-epicatequina-malvidina-3-O-glucósido e duas PS (bPRPs e aPRPs) foram estudadas por comparação com as interações entre as mesmas PS e cada uma

das espécies flavonóides individualmente. Verificou-se um efeito promotor da afinidade quando os dois polifenóis estavam presentes em relação às interações de cada um em separado. Algumas perguntas ficaram por responder, uma vez que o complexo ternário estudado requer a aplicação de diferentes métodos de análise. Além disto, o facto de as antocianinas serem compostos muito sensíveis às condições do meio, especialmente ao pH, é uma limitação a este tipo de estudos. Assim, sugere-se o recurso a técnicas adicionais, como simulações de dinâmica molecular ou HPLC, de modo a confirmar os resultados obtidos, particularmente ao nível do tipo de interações envolvidas. Estudos suplementares permitirão também aprofundar a análise dos resultados já obtidos, comparando-os de um ponto de vista mais crítico. Ainda, poderão ser utilizados ligandos (taninos e antocianinas) mais ambiciosos e comumente encontrados nos alimentos.

O desenvolvimento do amargor, cujo mecanismo molecular já se encontra descrito, está associado à ativação de recetores específicos da boca, os TAS2Rs. Os compostos definidos como amargos são capazes de interagir com estas proteínas e assim induzir uma cascata de sinalização que permite a perceção do sabor amargo. Alguns polifenóis foram já definidos como substâncias amargas por análises sensoriais. No entanto, a relação com a ativação dos diferentes TAS2Rs está ainda pouco explorada para muitos destes compostos. Neste sentido, diferentes polifenóis foram estudados por via de um sistema FLIPR, o qual permite medir os níveis de Ca^{2+} intracelular representativo da ativação dos TAS2Rs. Em particular, foi possível estabelecer as curvas dose-resposta e respetivos valores de EC_{50} de 10 compostos polifenólicos, estando a estes associada a ativação de 6 TAS2Rs diferentes. Numa segunda fase destes estudos relativos ao sabor amargo, pretendeu-se compreender se as PS poderiam afetar a ativação dos diferentes TAS2Rs pelos polifenóis. Assim, a ativação já reportada de 5 TAS2Rs por 4 polifenóis foi testada quando uma mistura de PS, em concentrações relativamente próximas às encontradas na saliva, seria adicionada. Apesar de alguns resultados não terem sido conclusivos, de um modo geral verificou-se uma redução da ativação nestas condições, sugerindo que as interações polifenol-PS têm um papel importante na perceção do sabor amargo. Em estudos futuros, seria oportuno estudar melhor esta relação, partindo agora para outras conjugações polifenol-TAS2R, de modo a confirmar este efeito de desativação associado às PS. Ainda, análises de diferentes complexos poderia também confirmar a falta de relação observada entre a redução da ativação dos TAS2Rs com o tempo de exposição às PS. Tendo em conta os vários estudos mencionados na literatura acerca do papel individual de cada família de PS na adstringência, poder-se-ia também testar o efeito de diferentes PS separadamente em alternativa ao conjunto total agora aplicado ao desenvolvimento do amargor.

VI. Referências

VI. Referências

- [1] de Freitas, V.; Mateus, N., Protein/Polyphenol interactions: Past and present contributions. Mechanisms of astringency perception. *Curr. Org. Chem.* **2012**, *16*, 724-746.
- [2] Bravo, L., Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **1998**, *56*, 317-333.
- [3] Drewnowski, A.; Gomez-Carneros, C., Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, *72*, 1424-35.
- [4] Fernandes, I.; Pérez-Gregorio, R.; Soares, S.; Mateus, N.; de Freitas, V., Wine Flavonoids in Health and Disease Prevention. *Molecules* **2017**, *22*, 292.
- [5] Zillich, O. V.; Schweiggert-Weisz, U.; Eisner, P.; Kersch, M., Polyphenols as active ingredients for cosmetic products. *Int. J. Cosmetic Sci.* **2015**, *37*, 455-64.
- [6] Petti, S.; Scully, C., Polyphenols, oral health and disease: A review. *J. Dent.* **2009**, *37*, 413-423.
- [7] Beart, J. E.; Lilley, T. H.; Haslam, E., Plant Polyphenols - Secondary Metabolism and Chemical Defense: Some Observations. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 33-38.
- [8] Scalbert, A.; Williamson, G., Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 2073s-85s.
- [9] Brouillard, R.; Delaporte, B., Chemistry of Anthocyanin Pigments. 2. Kinetic and Thermodynamic Study of Proton-Transfer, Hydration, and Tautomeric Reactions of Malvidin 3-Glucoside. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 8461-8468.
- [10] Castañeda-Ovando, A.; Pacheco-Hernández, M. d. L.; Páez-Hernández, M. E.; Rodríguez, J. A.; Galán-Vidal, C. A., Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem.* **2009**, *113*, 859-871.
- [11] Brouillard, R.; Lang, J., The Hemiacetal-*cis*-chalcone Equilibrium of Malvin, a Natural Anthocyanin. *Can. J. Chem.* **1990**, *68*, 755-761.
- [12] Escribano-Bailon, M. T.; Santos-Buelga, C., Anthocyanin Copigmentation - Evaluation, Mechanisms and Implications for the Colour of Red Wines. *Curr. Org. Chem.* **2012**, *16*, 715-723.
- [13] Soares, S.; Kohl, S.; Thalmann, S.; Mateus, N.; Meyerhof, W.; De Freitas, V., Different Phenolic Compounds Activate Distinct Human Bitter Taste Receptors. *J. Agr. Food Chem.* **2013**, *61*, 1525-1533.
- [14] Ferrer-Gallego, R.; Soares, S.; Mateus, N.; Rivas-Gonzalo, J.; Escribano-Bailón, M. T.; Freitas, V. d., New Anthocyanin-Human Salivary Protein Complexes. *Langmuir* **2015**, *31*, 8392-8401.
- [15] Gordillo, B.; Rodriguez-Pulido, F. J.; Gonzalez-Miret, M. L.; Quijada-Morin, N.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Garcia-Estevez, I.; Heredia, F. J.; Escribano-Bailon, M. T., Application of Differential Colorimetry To Evaluate Anthocyanin-Flavonol-Flavanol Ternary Copigmentation Interactions in Model Solutions. *J. Agr. Food Chem.* **2015**, *63*, 7645-53.

- [16] Aron, P. M.; Kennedy, J. A., Flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, 52, 79-104.
- [17] Chung, K. T.; Wong, T. Y.; Wei, C. I.; Huang, Y. W.; Lin, Y., Tannins and human health: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1998**, 38, 421-464.
- [18] Velayutham, P.; Babu, A.; Liu, D. M., Green tea catechins and cardiovascular health: An update. *Curr. Med. Chem.* **2008**, 15, 1840-1850.
- [19] Lu, J.; Ding, K.; Yuan, Q., Determination of Punicalagin Isomers in Pomegranate Husk. *Chromatographia* **2008**, 68, 303-306.
- [20] García-Estévez, I.; Escribano-Bailón, M. T.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Alcalde-Eon, C., Development of a fractionation method for the detection and identification of oak ellagitannins in red wines. *Anal. Chim. Acta* **2010**, 660, 171-176.
- [21] Harborne, J. B., The Flavonoids: Advances in Research Since 1986. *J. Chem. Educ.* **1995**, 72, A73.
- [22] Beecher, G. R., Overview of dietary flavonoids: Nomenclature, occurrence and intake. *J. Nutr.* **2003**, 133, 3248S-3254S.
- [23] Khanbabaee, K.; van Ree, T., Tannins: Classification and definition. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, 18, 641-649.
- [24] Obreque-Slier, E.; López-Solís, R.; Peña-Neira, Á.; Zamora-Marín, F., Tannin-protein interaction is more closely associated with astringency than tannin-protein precipitation: experience with two oenological tannins and a gelatin. *Int. J. Food Sci. Tech.* **2010**, 45, 2629-2636.
- [25] Chira, K.; Teissedre, P. L., Relation between volatile composition, ellagitannin content and sensory perception of oak wood chips representing different toasting processes. *Eur. Food Res. Technol.* **2013**, 236, 735-746.
- [26] Santos-Buelga, C.; Scalbert, A., Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agr.* **2000**, 80, 1094-1117.
- [27] Es-Safi, N.-E.; Cheynier, V.; Moutounet, M., Role of Aldehydic Derivatives in the Condensation of Phenolic Compounds with Emphasis on the Sensorial Properties of Fruit-Derived Foods. *J. Agr. Food Chem.* **2002**, 50, 5571-5585.
- [28] Fulcrand, H.; Doco, T.; Es-Safi, N.-E.; Cheynier, V.; Moutounet, M., Study of the acetaldehyde induced polymerisation of flavan-3-ols by liquid chromatography-ion spray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1996**, 752, 85-91.
- [29] Atanasova, V.; Fulcrand, H.; Le Guerneve, C.; Cheynier, W.; Moutounet, M., Structure of a new dimeric acetaldehyde malvidin 3-glucoside condensation product. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 6151-6153.
- [30] Vidal, S.; Francis, L.; Noble, A.; Kwiatkowski, M.; Cheynier, V.; Waters, E., Taste and mouth-feel properties of different types of tannin-like polyphenolic compounds and anthocyanins in wine. *Anal. Chim. Acta* **2004**, 513, 57-65.

- [31] Berg, H. W.; Akiyoshi, M. A., On the Nature of Reactions Responsible for Color Behavior in Red Wine: A Hypothesis. *Am. J. Enol. Viticult.* **1975**, 26, 134-143.
- [32] Sims, C. A.; Morris, J. R., Effects of Acetaldehyde and Tannins on the Color and Chemical Age of Red Muscadine (*Vitis-Rotundifolia*) Wine. *Am. J. Enol. Viticult.* **1986**, 37, 163-165.
- [33] Asen, S.; Stewart, R. N.; Norris, K. H., Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color. *Phytochemistry* **1972**, 11, 1139-1144.
- [34] Robinson, G. M.; Robinson, R., A survey of anthocyanins. I. *Biochem. J.* **1931**, 25, 1687-705.
- [35] Hoshino, T.; Matsumoto, U.; Goto, T.; Harada, N., Evidence for the self-association of anthocyanins IV. PMR spectroscopic evidence for the vertical stacking of anthocyanin molecules. *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23, 433-436.
- [36] Brouillard, R., Origin of the exceptional colour stability of the Zebrina anthocyanin. *Phytochemistry* **1981**, 20, 143-145.
- [37] Boulton, R., The Copigmentation of Anthocyanins and Its Role in the Color of Red Wine: A Critical Review. *Am. J. Enol. Viticult.* **2001**, 52, 67-87.
- [38] Baranac, J. M.; Petranović, N. A.; Dimitrić-Marković, J. M., Spectrophotometric Study of Anthocyan Copigmentation Reactions. *J. Agr. Food Chem.* **1996**, 44, 1333-1336.
- [39] Mazza, G.; Brouillard, R., The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions. *Phytochemistry* **1990**, 29, 1097-1102.
- [40] Brouillard, R.; Wigand, M.-C.; Dangles, O.; Cheminat, A., pH and solvent effects on the copigmentation reaction of malvin with polyphenols, purine and pyrimidine derivatives. *J. Chem. Soc. Perk. T. 2* **1991**, 1235-1241.
- [41] Mandel, I. D., The functions of saliva. *J. Dent. Res.* **1987**, 66 Spec No, 623-7.
- [42] Gibbins, H. L.; Carpenter, G. H., Alternative Mechanisms of Astringency – What is the Role of Saliva? *J. Texture Stud.* **2013**, 44, 364-375.
- [43] Bajec, M. R.; Pickering, G. J., Astringency: Mechanisms and perception. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2008**, 48, 858-875.
- [44] Dodds, M. W.; Johnson, D. A.; Yeh, C. K., Health benefits of saliva: a review. *J. Dent.* **2005**, 33, 223-33.
- [45] Brandão, E.; Soares, S.; Mateus, N.; de Freitas, V., Human saliva protein profile: Influence of food ingestion. *Food Res. Int.* **2014**, 64, 508-513.
- [46] Humphrey, S. P.; Williamson, R. T., A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *J. Prosthet. Dent.* **2001**, 85, 162-169.
- [47] Meurman, J. H.; Rytomaa, I.; Kari, K.; Laakso, T.; Murtomaa, H., Salivary pH and glucose after consuming various beverages, including sugar-containing drinks. *Caries Res.* **1987**, 21, 353-9.

- [48] Hans, R.; Thomas, S.; Garla, B.; Dagli, R. J.; Hans, M. K., Effect of Various Sugary Beverages on Salivary pH, Flow Rate, and Oral Clearance Rate amongst Adults. *Scientifica* **2016**, 6.
- [49] Sivadasan, P.; Gupta, M. K.; Sathe, G. J.; Balakrishnan, L.; Palit, P.; Gowda, H.; Suresh, A.; Kuriakose, M. A.; Sirdeshmukh, R., Human salivary proteome — a resource of potential biomarkers for oral cancer. *J. Proteomics* **2015**, 127, 89-95.
- [50] Dawes, C., Circadian-Rhythms in Human Salivary Flow-Rate and Composition. *J. Physiol.-London* **1972**, 220, 529-&.
- [51] Soares, S.; Vitorino, R.; Osorio, H.; Fernandes, A.; Venancio, A.; Mateus, N.; Amado, F.; de Freitas, V., Reactivity of human salivary proteins families toward food polyphenols. *J. Agr. Food Chem.* **2011**, 59, 5535-47.
- [52] Messana, I.; Inzitari, R.; Fanali, C.; Cabras, T.; Castagnola, M., Facts and artifacts in proteomics of body fluids. What proteomics of saliva is telling us? *J. Sep. Sci.* **2008**, 31, 1948-63.
- [53] Naurato, N.; Wong, P.; Lu, Y.; Wroblewski, K.; Bennick, A., Interaction of Tannin with Human Salivary Histatins. *J. Agr. Food Chem.* **1999**, 47, 2229-2234.
- [54] Soares, S.; Mateus, N.; Freitas, V., Interaction of different polyphenols with bovine serum albumin (BSA) and human salivary alpha-amylase (HSA) by fluorescence quenching. *J. Agr. Food Chem.* **2007**, 55, 6726-35.
- [55] Liang, H.; Wang, Y.; Wang, Q.; Ruan, M.-s., Hydrophobic interaction chromatography and capillary zone electrophoresis to explore the correlation between the isoenzymes of salivary α -amylase and dental caries. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **1999**, 724, 381-388.
- [56] Sarni-Manchado, P.; Canals-Bosch, J. M.; Mazerolles, G.; Cheynier, V., Influence of the Glycosylation of Human Salivary Proline-Rich Proteins on Their Interactions with Condensed Tannins. *J. Agr. Food Chem.* **2008**, 56, 9563-9569.
- [57] Boze, H.; Marlin, T.; Durand, D.; Perez, J.; Vernhet, A.; Canon, F.; Sarni-Manchado, P.; Cheynier, V.; Cabane, B., Proline-Rich Salivary Proteins Have Extended Conformations. *Biophys. J.* **2010**, 99, 656-665.
- [58] Messana, I.; Cabras, T.; Inzitari, R.; Lupi, A.; Zuppi, C.; Olmi, C.; Fadda, M. B.; Cordaro, M.; Giardina, B.; Castagnola, M., Characterization of the human salivary basic proline-rich protein complex by a proteomic approach. *J. Proteome Res.* **2004**, 3, 792-800.
- [59] Inzitari, R.; Cabras, T.; Onnis, G.; Olmi, C.; Mastinu, A.; Sanna, M. T.; Pellegrini, M. G.; Castagnola, M.; Messana, I., Different isoforms and post-translational modifications of human salivary acidic proline-rich proteins. *Proteomics* **2005**, 5, 805-15.
- [60] Lu, Y.; Bennick, A., Interaction of tannin with human salivary proline-rich proteins. *Arch. Oral Biol.* **1998**, 43, 717-28.
- [61] Hatton, M. N.; Loomis, R. E.; Levine, M. J.; Tabak, L. A., Masticatory Lubrication - The Role of Carbohydrate in the Lubricating Property of a Salivary Glycoprotein Albumin Complex. *Biochem. J.* **1985**, 230, 817-820.

- [62] McArthur, C.; Sanson, G. D.; Beal, A. M., Salivary Proline-Rich Proteins in Mammals - Roles in Oral Homeostasis and Counteracting Dietary Tannin. *J. Chem. Ecol.* **1995**, *21*, 663-691.
- [63] Vitorino, R.; Alves, R.; Barros, A.; Caseiro, A.; Ferreira, R.; Lobo, M. C.; Bastos, A.; Duarte, J.; Carvalho, D.; Santos, L. L.; Amado, F. L., Finding new posttranslational modifications in salivary proline-rich proteins. *Proteom. Clin. Appl.* **2011**, *5*, 197-197.
- [64] Soares, S.; Mateus, N.; de Freitas, V., Interaction of different classes of salivary proteins with food tannins. *Food Res. Int.* **2012**, *49*, 807-813.
- [65] Brandao, E.; Soares, S.; Mateus, N.; de Freitas, V., In vivo interactions between procyanidins and human saliva proteins: effect of repeated exposures to procyanidins solution. *J. Agr. Food Chem.* **2014**, *62*, 9562-8.
- [66] Schlesinger, D. H.; Hay, D. I.; Levine, M. J., Complete primary structure of statherin, a potent inhibitor of calcium phosphate precipitation, from the saliva of the monkey, *Macaca arctoides*. *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1989**, *34*, 374-80.
- [67] Sabatini, L. M.; Carlock, L. R.; Johnson, G. W.; Azen, E. A., cDNA Clonind and Chromosomal Localization (4q11-13) of a Gene of Statherin, a Regulator of Calcium in Saliva. *Am. J. Hum. Genet.* **1987**, *41*, 1048-1060.
- [68] Isemura, S.; Saitoh, E., Nucleotide sequence of gene PBI encoding a protein homologous to salivary proline-rich protein P-B. *J. Biochem.* **1997**, *121*, 1025-30.
- [69] Henskens, Y. M. C.; Veerman, E. C. I.; Mantel, M. S.; Velden, U. v. d.; Amerongen, A. V. N., Cystatins S and C in Human Whole Saliva and in Glandular Salivas in Periodontal Health and Disease. *J. Dent. Res.* **1994**, *73*, 1606-1614.
- [70] Oppenheim, F. G.; Xu, T.; McMillian, F. M.; Levitz, S. M.; Diamond, R. D.; Offner, G. D.; Troxler, R. F., Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 7472-7.
- [71] Carvalho, E.; Mateus, N.; de Freitas, V., Flow nephelometric analysis of protein-tannin interactions. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *513*, 97-101.
- [72] Bate-Smith, E. C., Tannins of Herbaceous Leguminosae. *Phytochemistry* **1973**, *12*, 1809-1812.
- [73] Goldstein, J. L.; Swain, T., The inhibition of enzymes by tannins. *Phytochemistry* **1965**, *4*, 185-192.
- [74] Hasni, I.; Bourassa, P.; Hamdani, S.; Samson, G.; Carpentier, R.; Tajmir-Riahi, H.-A., Interaction of milk α - and β -caseins with tea polyphenols. *Food Chem.* **2011**, *126*, 630-639.
- [75] Okuda, T.; Mori, K.; Hatano, T., Relationship of the Structures of Tannins to the Binding Activities with Hemoglobin and Methylene Blue. *Chem. Pharma. Bull.* **1985**, *33*, 1424-1433.
- [76] Brandao, E.; Santos Silva, M.; Garcia-Estevez, I.; Mateus, N.; de Freitas, V.; Soares, S., Molecular study of mucin-procyanidin interaction by fluorescence quenching and Saturation Transfer Difference (STD)-NMR. *Food Chem.* **2017**, *228*, 427-434.

- [77] Rawel, H. M.; Meidtner, K.; Kroll, J., Binding of Selected Phenolic Compounds to Proteins. *J. Agr. Food Chem.* **2005**, 53, 4228-4235.
- [78] Hagerman, A. E.; Butler, L. G., The Specificity of Proanthocyanidin-Protein Interactions. *J. Biol. Chem.* **1981**, 256, 4494-4497.
- [79] Deaville, E. R.; Green, R. J.; Mueller-Harvey, I.; Willoughby, I.; Frazier, R. A., Hydrolyzable tannin structures influence relative globular and random coil protein binding strengths. *J. Agr. Food Chem.* **2007**, 55, 4554-4561.
- [80] Baxter, N. J.; Lilley, T. H.; Haslam, E.; Williamson, M. P., Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation. *Biochemistry* **1997**, 36, 5566-5577.
- [81] Asano, K. S., K.; Hashimoto, N., Characterization of Haze-Forming Proteins of Beer and Their Roles in Chill Haze Formation. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **1982**, 40, 147-154.
- [82] Lins, L.; Thomas, A.; Brasseur, R., Analysis of accessible surface of residues in proteins. *Protein Sci.* **2003**, 12, 1406-17.
- [83] Xiao, J. B.; Suzuki, M.; Jiang, X. Y.; Chen, X. Q.; Yamamoto, K.; Ren, F. L.; Xu, M., Influence of B-Ring Hydroxylation on interactions of flavonols with bovine serum albumin. *J. Agr. Food Chem.* **2008**, 56, 2350-2356.
- [84] Pianet, I.; Andre, Y.; Ducasse, M. A.; Tarascou, I.; Lartigue, J. C.; Pinaud, N.; Fouquet, E.; Dufourc, E. J.; Laguerre, M., Modeling procyanidin self-association processes and understanding their micellar organization: A study by diffusion NMR and molecular mechanics. *Langmuir* **2008**, 24, 11027-11035.
- [85] Loomis, W. D., Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. *Method. Enzymol.* **1974**, 31, 528-44.
- [86] Oh, H. I.; Hoff, J. E.; Armstrong, G. S.; Haff, L. A., Hydrophobic interaction in tannin-protein complexes. *J. Agr. Food Chem.* **1980**, 28, 394-398.
- [87] Charlton, A. J.; Baxter, N. J.; Khan, M. L.; Moir, A. J. G.; Haslam, E.; Davies, A. P.; Williamson, M. P., Polyphenol/peptide binding and precipitation. *J. Agr. Food Chem.* **2002**, 50, 1593-1601.
- [88] Canon, F.; Giuliani, A.; Pate, F.; Sarni-Manchado, P., Ability of a salivary intrinsically unstructured protein to bind different tannin targets revealed by mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, 398, 815-22.
- [89] Hagerman, A. E.; Rice, M. E.; Ritchard, N. T., Mechanisms of protein precipitation for two tannins, pentagalloyl glucose and epicatechin(16) (4 -> 8) catechin (procyanidin). *J. Agr. Food Chem.* **1998**, 46, 2590-2595.
- [90] McManus, J. P.; Davis, K. G.; Lilley, T. H.; Haslam, E., The association of proteins with polyphenols. *Chem. Commun.* **1981**, 309b-311.
- [91] Siebert, K. J.; Troukhanova, N. V.; Lynn, P. Y., Nature of Polyphenol-Protein Interactions. *J. Agr. Food Chem.* **1996**, 44, 80-85.

- [92] Jöbstl, E.; O'Connell, J.; Fairclough, J. P. A.; Williamson, M. P., Molecular Model for Astringency Produced by Polyphenol/Protein Interactions. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 942-949.
- [93] Hagerman, A. E.; Robbins, C. T., Implications of Soluble Tannin-Protein Complexes for Tannin Analysis and Plant Defense Mechanisms. *J. Chem. Ecol.* **1987**, *13*, 1243-1259.
- [94] Mehansho, H.; Butler, L. G.; Carlson, D. M., Dietary Tannins and Salivary Proline-Rich Proteins: Interactions, Induction, and Defense-Mechanisms. *Annu. Rev. Nutr.* **1987**, *7*, 423-440.
- [95] Cai, K. H.; Bennick, A., Effect of salivary proteins on the transport of tannin and quercetin across intestinal epithelial cells in culture. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, *72*, 974-980.
- [96] Griffiths, D. W., The inhibition of digestive enzymes by polyphenolic compounds. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1986**, *199*, 509-16.
- [97] Arts, M.; Haenen, G.; Wilms, L. C.; Beetstra, S.; Heijnen, C. G. M.; Voss, H. P.; Bast, A., Interactions between flavonoids and proteins: Effect on the total antioxidant capacity. *J. Agr. Food Chem.* **2002**, *50*, 1184-1187.
- [98] Diniz, A.; Escuder-Gilabert, L.; Lopes, N. P.; Villanueva-Camanas, R. M.; Sagrado, S.; Medina-Hernandez, M. J., Characterization of interactions between polyphenolic compounds and human serum proteins by capillary electrophoresis. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 625-632.
- [99] Bacon, J. R.; Rhodes, M. J. C., Development of a competition assay for the evaluation of the binding of human parotid salivary proteins to dietary complex phenols and tannins using a peroxidase-labeled tannin. *J. Agr. Food Chem.* **1998**, *46*, 5083-5088.
- [100] de Freitas, V.; Mateus, N., Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. *J. Agr. Food Chem.* **2001**, *49*, 940-5.
- [101] De Freitas, V.; Mateus, N., Nephelometric study of salivary protein-tannin aggregates. *J. Sci. Food Agr.* **2002**, *82*, 113-119.
- [102] Asquith, T. N.; Uhlig, J.; Mehansho, H.; Putman, L.; Carlson, D. M.; Butler, L., Binding of Condensed Tannins to Salivary Proline-Rich Glycoproteins - The Role of Carbohydrate. *J. Agr. Food Chem.* **1987**, *35*, 331-334.
- [103] Haslam, E., Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 205-215.
- [104] Green, B. G., Oral Astringency - A Tactile Component of Flavor. *Acta Psychol.* **1993**, *84*, 119-125.
- [105] Lee, C. B.; Lawless, H. T., Time-Course of Astringent Sensations. *Chem. Senses* **1991**, *16*, 225-238.
- [106] Guinard, J. X.; Pangborn, R. M.; Lewis, M. J., The Time-Course of Astringency in Wine Upon Repeated Ingestion. *Am. J. Enol. Viticult.* **1986**, *37*, 184-189.

- [107] Schiffman, S. S.; Suggs, M. S.; Sostman, A. L.; Simon, S. A., Chorda Tympani and Lingual Nerve Responses to Astringent Compounds in Rodents. *Physiol. Behav.* **1992**, *51*, 55-63.
- [108] Breslin, P. A. S.; Gilmore, M. M.; Beauchamp, G. K.; Green, B. G., Psychophysical Evidence That Oral Astringency is a Tactile Sensation. *Chem. Senses* **1993**, *18*, 405-417.
- [109] Jiang, Y.; Gong, N. H. N.; Matsunami, H., Astringency: A More Stringent Definition. *Chem. Senses* **2014**, *39*, 467-469.
- [110] Noble, A. C., Why Do Wines Taste Bitter and Feel Astringent? In *Chemistry of Wine Flavor*, American Chemical Society: **1998**; Vol. 714, pp 156-165.
- [111] Lee, C. A.; Ismail, B.; Vickers, Z. M., The role of salivary proteins in the mechanism of astringency. *J. Food Sci.* **2012**, *77*, C381-7.
- [112] Lyman, B. J.; Green, B. G., Oral Astringency: Effects of Repeated Exposure and Interactions with Sweeteners. *Chem. Senses* **1990**, *15*, 151-164.
- [113] Arnold, R. A.; Noble, A. C.; Singleton, V. L., Bitterness and astringency of phenolic fractions in wine. *J. Agr. Food Chem.* **1980**, *28*, 675-678.
- [114] Hagerman, A. E., Chemistry of Tannin-Protein Complexation. In *Chemistry and Significance of Condensed Tannins*, Hemingway, R. W.; Karchesy, J. J.; Branham, S. J., Eds. Springer US: Boston, MA, **1989**; pp 323-333.
- [115] Kallithraka, S.; Bakker, J.; Clifford, M. N., Evidence That Salivary Proteins are Involved in Astringency. *J. Sens. Stud.* **1998**, *13*, 29-43.
- [116] De Wijk, R. A.; Prinz, J. F., Mechanisms underlying the role of friction in oral texture. *J. Texture Stud.* **2006**, *37*, 413-427.
- [117] Kallithraka, S.; Bakker, J.; Clifford, M. N., Evaluation of Bitterness and Astringency of (+)-catechin and (-)-epicatechin in Red Wine and in Model Solutions. *J. Sens. Stud.* **1997**, *12*, 25-37.
- [118] Thorngate, J. H.; Noble, A. C., Sensory evaluation of bitterness and astringency of 3R(-)-epicatechin and 3S(+)-catechin. *J. Sci. Food Agr.* **1995**, *67*, 531-535.
- [119] Payne, C.; Bowyer, P. K.; Herderich, M.; Bastian, S. E. P., Interaction of astringent grape seed procyanidins with oral epithelial cells. *Food Chem.* **2009**, *115*, 551-557.
- [120] Soares, S.; Ferrer-Galego, R.; Brandão, E.; Silva, M.; Mateus, N.; De Freitas, V., Contribution of Human Oral Cells to Astringency by Binding Salivary Protein/Tannin Complexes. *J. Agr. Food Chem.* **2016**, *64*, 7823-7828.
- [121] Joslyn, M. A.; Goldstein, J. L., Astringency of fruit and fruit products in relation to leucoanthocyanin content. *Calif. Agr.* **1964**, *18*, 13-14.
- [122] Pydi, S. P.; Bhullar, R. P.; Chelikani, P., Constitutive Activity of Bitter Taste Receptors (T2Rs). *Adv. Pharmacol.* **2014**, *70*, 303-326.
- [123] Margolskee, R. F., Molecular mechanisms of bitter and sweet taste transduction. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 1-4.

- [124] Roper, S. D., Signal transduction and information processing in mammalian taste buds. *Pflug. Arch. Eur. J. Phy.* **2007**, *454*, 759-776.
- [125] Chandrashekar, J.; Mueller, K. L.; Hoon, M. A.; Adler, E.; Feng, L.; Guo, W.; Zuker, C. S.; Ryba, N. J., T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell* **2000**, *100*, 703-11.
- [126] Lindemann, B., Chemoreception: Tasting the sweet and the bitter. *Curr. Biol.* **1996**, *6*, 1234-1237.
- [127] Wong, G. T.; Gannon, K. S.; Margolskee, R. F., Transduction of bitter and sweet taste by gustducin. *Nature* **1996**, *381*, 796-800.
- [128] Conte, C.; Ebeling, M.; Marcuz, A.; Nef, P.; Andres-Barquin, P. J., Identification and characterization of human taste receptor genes belonging to the TAS2R family. *Cytogenet. Genome Res.* **2002**, *98*, 45-53.
- [129] Behrens, M.; Brockhoff, A.; Kuhn, C.; Bufe, B.; Winnig, M.; Meyerhof, W., The human taste receptor hTAS2R14 responds to a variety of different bitter compounds. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **2004**, *319*, 479-85.
- [130] Bufe, B.; Breslin, P. A. S.; Kuhn, C.; Reed, D. R.; Tharp, C. D.; Slack, J. P.; Kim, U. K.; Drayna, D.; Meyerhof, W., The molecular basis of individual differences in phenylthiocarbamide and propylthiouracil bitterness perception. *Curr. Biol.* **2005**, *15*, 322-327.
- [131] Meyerhof, W., Elucidation of mammalian bitter taste. In *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology, Vol 154*, Offermanns, S.; Amara, S. G.; Bamberg, E.; Grinstein, S.; Hebert, S. C.; Jahn, R.; Lederer, W. J.; Lill, R.; Miyajima, A.; Murer, H.; Schultz, G.; Schweiger, M., Eds. Springer-Verlag Berlin: Berlin, **2005**; Vol. 154, pp 37-72.
- [132] Robichaud, J. L.; Noble, A. C., Astringency and bitterness of selected phenolics in wine. *J. Sci. Food Agr.* **1990**, *53*, 343-353.
- [133] Hufnagel, J. C.; Hofmann, T., Quantitative reconstruction of the nonvolatile sensometabolome of a red wine. *J. Agr. Food Chem.* **2008**, *56*, 9190-9199.
- [134] Noble, A. C., Bitterness in wine. *Physiol. Behav.* **1994**, *56*, 1251-5.
- [135] Peleg, H.; Gacon, K.; Schlich, P.; Noble, A. C., Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers. *J. Sci. Food Agr.* **1999**, *79*, 1123-1128.
- [136] Carvalho, E.; Mateus, N.; Plet, B.; Pianet, I.; Dufourc, E.; De Freitas, V., Influence of Wine Pectic Polysaccharides on the Interactions between Condensed Tannins and Salivary Proteins. *J. Agr. Food Chem.* **2006**, *54*, 8936-8944.
- [137] de Freitas, V. A. P.; Glories, Y.; Laguerre, M., Incidence of Molecular Structure in Oxidation of Grape Seed Procyanidins. *J. Agr. Food Chem.* **1998**, *46*, 376-382.
- [138] Bras, N. F.; Goncalves, R.; Fernandes, P. A.; Mateus, N.; Ramos, M. J.; de Freitas, V., Understanding the binding of procyanidins to pancreatic elastase by experimental and computational methods. *Biochemistry* **2010**, *49*, 5097-108.
- [139] Lakowicz, J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy* Springer US: **2006**; Vol. 3rd Edition.

- [140] Dias, R.; Perez-Gregorio, R.; Mateus, N.; De Freitas, V., The interaction between tannins and gliadin derived peptides in a celiac disease perspective. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 32151-32158.
- [141] Ferreira, M.; Gameiro, P., Ciprofloxacin metalloantibiotic: an effective antibiotic with an influx route strongly dependent on lipid interaction? *J. Membrane Biol.* **2015**, *248*, 125-36.
- [142] Viegas, A.; Manso, J.; Nobrega, F. L.; Cabrita, E. J., Saturation-Transfer Difference (STD) NMR: A Simple and Fast Method for Ligand Screening and Characterization of Protein Binding. *J. Chem. Educ.* **2011**, *88*, 990-994.
- [143] Silva, M. S.; Garcia-Estevez, I.; Brandao, E.; Mateus, N.; de Freitas, V.; Soares, S., Molecular Interaction Between Salivary Proteins and Food Tannins. *J. Agr. Food Chem.* **2017**, *65*, 6415-6424.
- [144] Meyerhof, W.; Batram, C.; Kuhn, C.; Brockhoff, A.; Chudoba, E.; Bufe, B.; Appendino, G.; Behrens, M., The Molecular Receptive Ranges of Human TAS2R Bitter Taste Receptors. *Chem. Senses* **2010**, *35*, 157-170.
- [145] Du Penhoat, C. L. M. H.; Michon, V. M. F.; Peng, S.; Viriot, C.; Scalbert, A.; Gage, D., Structural elucidation of new dimeric ellagitannins from *Quercus robur* L. roburins A-E. *J. Chem. Soc. Perk. T. 1* **1991**, 1653-1660.
- [146] Zaruwa, M. Z.; Manosroi, J.; Akihisa, T., Castalagin from *Anogeissus acuminata* (Roxb.ex.DC) Guill. Ex. Perr, a potent Hypoglycaemic Agent. *Int. J. Curr. Res. Acad. Rev.* **2015**, *3*, 147-152.
- [147] Kraszni, M.; Marosi, A.; Larive, C. K., NMR assignments and the acid-base characterization of the pomegranate ellagitannin punicalagin in the acidic pH-range. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 5807-5816.
- [148] Tarascou, I.; Barathieu, K.; Simon, C.; Ducasse, M. A.; Andre, Y.; Fouquet, E.; Dufourc, E. J.; de Freitas, V.; Laguerre, M.; Pianet, I., A 3D structural and conformational study of procyanidin dimers in water and hydro-alcoholic media as viewed by NMR and molecular modeling. *Magn. Reson. Chem.* **2006**, *44*, 868-80.
- [149] Esatbeyoglu, T.; Wray, V.; Winterhalter, P., Dimeric procyanidins: screening for B1 to B8 and semisynthetic preparation of B3, B4, B6, And B8 from a polymeric procyanidin fraction of white willow bark (*Salix alba*). *J. Agr. Food Chem.* **2010**, *58*, 7820-30.
- [150] Gonçalves, R.; Mateus, N.; Pianet, I.; Laguerre, M.; de Freitas, V., Mechanisms of Tannin-Induced Trypsin Inhibition: A Molecular Approach. *Langmuir* **2011**, *27*, 13122-13129.
- [151] Cala, O.; Dufourc, E. J.; Fouquet, E.; Manigand, C.; Laguerre, M.; Pianet, I., The Colloidal State of Tannins Impacts the Nature of Their Interaction with Proteins: The Case of Salivary Proline-Rich Protein/Procyanidins Binding. *Langmuir* **2012**, *28*, 17410-17418.
- [152] Cala, O.; Pinaud, N.; Simon, C.; Fouquet, E.; Laguerre, M.; Dufourc, E. J.; Pianet, I., NMR and molecular modeling of wine tannins binding to saliva proteins: revisiting astringency from molecular and colloidal prospects. *Faseb J.* **2010**, *24*, 4281-4290.

- [153] Vivas, N.; Laguerre, M.; De Boissel, I. P.; De Gaijlejac, N. V.; Nonier, M. F., Conformational interpretation of vescalagin and castalagin physicochemical properties. *J. Agr. Food Chem.* **2004**, 52, 2073-2078.
- [154] Ricardo-Da-Silva, J. M.; Cheynier, V.; Souquet, J. M.; Moutounet, M.; Cabanis, J. C.; Bourzeix, M., Interaction of Grape Seed Procyanidins with Various Proteins in Relation to Wine Fining. *J. Sci. Food Agr.* **1991**, 57, 111-125.
- [155] Porto, P.; Laranjinha, J. A. N.; de Freitas, V. A. P., Antioxidant protection of low density lipoprotein by procyanidins: structure/activity relationships. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, 66, 947-954.
- [156] Obreque-Slier, E.; Espinola-Espinola, V.; Lopez-Solis, R., Wine pH Prevails over Buffering Capacity of Human Saliva. *J. Agr. Food Chem.* **2016**, 64, 8154-8159.
- [157] Davis, A. L.; Cai, Y.; Davies, A. P.; Lewis, J. R., ¹H and ¹³C NMR Assignments of Some Green Tea Polyphenols. *Magn. Reson. Chem.* **1996**, 34, 887-890.
- [158] Capitani, D.; Sobolev, A. P.; Delfini, M.; Vista, S.; Antiochia, R.; Proietti, N.; Bubici, S.; Ferrante, G.; Carradori, S.; De Salvador, F. R.; Mannina, L., NMR methodologies in the analysis of blueberries. *Electrophoresis* **2014**, 35, 1615-1626.
- [159] Artimo, P.; Jonnalagedda, M.; Arnold, K.; Baratin, D.; Csardi, G.; de Castro, E.; Duvaud, S.; Flegel, V.; Fortier, A.; Gasteiger, E.; Grosdidier, A.; Hernandez, C.; Ioannidis, V.; Kuznestsov, D.; Liechti, R.; Moretti, S.; Mostaguir, K.; Redaschi, N.; Rossier, G.; Xenarios, I.; Stockinger, H. *ExPASy: SIB Bioinformatics Resource Portal*, **2012**, 40(W1):W597-W603
- [160] Ross, P. D.; Subramanian, S., Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry* **1981**, 20, 3096-3102.
- [161] Bufo, B.; Hofmann, T.; Krautwurst, D.; Raguse, J. D.; Meyerhof, W., The human TAS2R16 receptor mediates bitter taste in response to beta-glucopyranosides. *Nat. Genet.* **2002**, 32, 397-401.
- [162] Roland, W. S. U.; Vincken, J. P.; Gouka, R. J.; van Buren, L.; Gruppen, H.; Smit, G., Soy Isoflavones and Other Isoflavonoids Activate the Human Bitter Taste Receptors hTAS2R14 and hTAS2R39. *J. Agr. Food Chem.* **2011**, 59, 11764-11771.
- [163] Michel, J.; Jourdes, M.; Silva, M. A.; Giordanengo, T.; Mourey, N.; Teissedre, P. L., Impact of Concentration of Ellagitannins in Oak Wood on Their Levels and Organoleptic Influence in Red Wine. *J. Agr. Food Chem.* **2011**, 59, 5677-5683.
- [164] Intelmann, D.; Batram, C.; Kuhn, C.; Haseleu, G.; Meyerhof, W.; Hofmann, T., Three TAS2R Bitter Taste Receptors Mediate the Psychophysical Responses to Bitter Compounds of Hops (*Humulus lupulus* L.) and Beer. *Chemosens. Percept.* **2009**, 2, 118-132.